

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**ASTACUS LEPTODACTYLUS (ESCH., 1823)'LARDA TRİFLOKSİSTROBİN'İN
AKUT TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bülent ÇİMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

I.DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ

TUNCELİ– 2021

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ASTACUS LEPTODACTYLUS (ESCH., 1823)'LARDA TRİFLOKSİSTROBİN'İN
AKUT TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bülent ÇİMEN
(171106105)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

I. DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ

TUNCELİ– 2021

.../.../2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
Bülent ÇİMEN

Danışman
Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ

TEŞEKKÜRLER

Çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ'ye, tez sürecinde benden destek ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ ve Miraç UÇKUN'a, çalışmalarımı sağlıklı bir şekilde yürütmemde laboratuvarlarını kullandığım Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dekanlığı 'na, yüksek lisansım boyunca her an destek olup yanımda bulunan arkadaşım Hülya ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bülent ÇİMEN
TUNCELİ – 2021



İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜRLER.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Astacus Leptodactylus'un Biyolojisi.....	3
1.1.1. Dış anatomisi	3
1.1.2. İç anatomisi ve sindirim sistemi	4
1.1.3. Solunum sistemi	5
1.1.4. Yaşam alanları	5
1.1.5. Beslenme ve büyümeleri	6
1.1.6. Üremeleri	7
1.2. Serbest Radikaller.....	8
1.2.1. Serbest radikal kaynakları	8
1.2.2. Reaktif oksijen türleri	8
1.2.3. Serbest radikallerin yararları	10
1.2.4. Serbest radikallerin zararları.....	11
1.2.4.1. Membran lipidleri üzerine etkileri	11
1.2.5. Lipid peroksidasyon oluşumu.....	12
1.2.6. Protein, dna ve karbonhidratlar üzerine etkisi	13
1.2.7. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma	13
1.2.8. Toksikolojide serbest radikaller.....	15
1.3. Pestisit.....	16
1.3.1. Pestisitlerin çevre üzerine etkisi	17
1.3.2. Pestisitlerin Su Canlıları Üzerine Etkisi	18
1.3.3. Strobilurinler.....	19
2. MATERYAL VE METODLAR.....	22
2.1. Materyal.....	22
2.1.1. Araştırma süresi ve yeri	22
2.1.2. Araştırmada kullanılan pestisit	22
2.1.3. Kerevitlerin sağlanması	22
2.1.4. Kerevitlerin yem bileşimi	22
2.1.5. Araştırmada kullanılan suyun özellikleri.....	24
2.1.6. Diğer araç ve gereçler.....	24
2.2. Metot.....	25
2.2.1. Araştırmanın planlanması ve kurulması	25
2.2.2. Kerevit yeminin hazırlanması.....	25
2.2.4. Kerevitlerin subakut toksisite deneyleri	26
2.2.5. Kerevit dokularının homojenizasyon ve santrifüj işlemleri	27
2.2.6. Biyokimyasal parametrelerin belirlenmesi.....	27
2.2.7. Oksidatif stresin (mda) tayini	28
2.3. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar.....	33
3. BULGULAR	34

4. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
5. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>Astacus leptodactylus</i> 'un dorsalden görünümü	3
Şekil 1.2. Kerevitlerin dorsalden (a) ve ventralden (b) vücut kısımlarının adlandırılması (Mazlum ve Yılmaz, 2012).	4
Şekil 1.3. Serbest radikal mekanizması (Kavas, 1989).	14
Şekil 1.4. Strobilurinlerin temel yapıları (Uçkun, 2013).....	19
Şekil 1.5. Trifloksistrobinin moleküler yapısı (Uçkun, 2013).	21
Şekil 2.1. Malondialdehit (mda) standart eğrisi	29
Şekil 2.2. Redükte glutasyon (gsh) standart eğrisi.....	32
Şekil 2.3. Bovine serum albumin (bsa) standart eğrisi.....	32
Şekil 3.1. 96 saat boyunca trifloxystrobin'in lc50, lc50/2, lc50/4 ve lc50/8 dozlarına maruz bırakılmış kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki mda düzeylerine ait yüzde değişimleri	35
Şekil 3.2. 96 saat boyunca trifloxystrobin'in lc50, lc50/2, lc50/4 ve lc50/8 dozlarına maruz bırakılmış kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki sod ve gsh-px enzimlerine ait yüzde aktivite değişimleri	36
Şekil 3.3. 96 saat boyunca trifloxystrobin'in lc50, lc50/2, lc50/4 ve lc50/8 dozlarına maruz bırakılmış kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki redükte glutasyon (gsh) düzeylerine ait yüzde değişimleri	37

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Kerevitlerde su kalitesi değerleri.....	6
Tablo 1.2. Antioksidanlar (Akkuş, 1995).....	13
Tablo 1.3. Türkiyede 2014-2018 yılları arasında pestisit kullanımı (url 1).....	16
Tablo 2.1. Araştırmada kullanılan yemin yapısına giren yem maddelerinin bileşimi (%).....	23
Tablo 2.2. Araştırmada kullanılan yemin ham besin madde düzeyleri (%)	23
Tablo 2.3. Araştırmada kullanılan yemin toplam enerji, protein/enerji düzeyleri, suda çözünme süresi, ph'sı, peletin çapı ve boyuna ait değerler.....	24
Tablo 2.4. Araştırma suyunun özellikleri	24



KISALTMALAR LİSTESİ

ATPaz	: Adenozin trifosfataz
CDNB	: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CaCO₃	: Kalsiyum bikarbonat
DTNB	: 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
IU	: Ünite GSSG
LC50	: Ortalama öldürücü konsantrasyon
MDA	: Malondialdehit
O₂^{-*}	: Süperoksit anyonu
O₂^{2-*}	: Peroksit anyonu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
*OH	: Hidroksil radikali
R*	: Karbon merkezli radikal
LPO	: Lipid peroksidasyon
RO*	: Alkoksil radikali
ROO*	: Peroksit radikali
NAD+	: Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
TFS	: Trifloksistrobin
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ROOH	: Hidroperoksit radikali

ÖZET

Dünyada tarım alanlarından elde edilen ürün miktarını arttırmak için en fazla kullanılan yöntem, kimyasal yöntemlerdir. Kimyasal mücadelenin temelinde ise pestisit olan sentetik zirai maddeler vardır. Bu çalışmada *A. leptodactylus* türü kerevitler üzerine strobilurin grubu fungusitlerden Trifloksistrobinin (TFS) toksik etkilerinin çeşitli biyokimyasal belirteçler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 96 saatlik test sonucunda TFS'nin ortalama öldürücü konsantrasyon değeri (LC_{50}) değeri 1824.00 mg AI/L olarak tespit edildi. Seçilen pestisit uygulama konsantrasyonu 96 saatlik LC_{50} değerlerine göre belirlendi. Kerevitler TFS'nin LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/8$ konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Kerevitlerde pestisitlerin etkileri; hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki lipid peroksidasyon (MDA), süperoksit düsmütaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon (GSH) düzeyleri tespit edilerek belirlendi. Trifloksistrobinin 96 saatlik uygulamaları sonucunda, TFS'nin LC_{50} değerlerinin bütün kerevitleri öldürdüğü belirlendi. Pestisit LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/8$ konsantrasyonlarının seçilen biyobelirteç enzimleri (aktivasyon/inhibisyon) ve oksidatif stresi istatistiksel açıdan önemli düzeyde etkilediği tespit edildi.

Araştırma sonuçları, TFS'nin kerevitlerde toksik potansiyele sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca, bu pestisit LC_{50} ve $LC_{50}/2$ değerlerinden çok daha düşük konsantrasyonlarda etki gösterdiği belirlendi. Bunlara ilave olarak araştırma sonuçları; *A. leptodactylus* türü kerevitlerin sucul ekosistemlerde, pestisit kirliliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmalar için uygun bir test organizması olduğunu ve seçilen biyokimyasal belirteçlerin de pestisit toksisitesini iyi bir şekilde yansıttığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *A. leptodactylus*, Trifloksistrobin, MDA, SOD, GSH-Px, GSH

ABSTRACT

Investigation of Acute Toxic Effects of Trifloxystrobin on *Astacus leptodactylus* (Esch., 1823)

Chemical methods are the most used method to increase the amount of products obtained from agricultural areas in the world. On the basis of chemical control, there are synthetic agricultural substances that are pesticides. This study aimed to evaluate toxicity of strobilurin fungicide trifloxystrobin, on *A. leptodactylus* species crayfish by using various biochemical markers. In the result of 96-hour test, median lethal concentration (LC₅₀) values of TFS were determined as 1824.00 mg AI/L. The application concentrations of selected pesticide were determined according to the 96-hour LC₅₀. The crayfish were exposed to LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 and LC₅₀/8 concentrations of TFS. The effects of pesticides were determined by lipid peroxidation (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione (GSH) levels in the hepatopancreas, muscle and gills tissues. In the results of 96-hour of TFS in LC₅₀ value caused to the death of all crayfish. The LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 concentrations of pesticide affected significantly as statistically selected enzyme (inhibited/activated) and oxidative stress markers.

The results indicated that selected pesticide have toxic potential on crayfish. Furthermore, showed a toxic effect on crayfish at concentrations much lower than their LC₅₀/2 or LC₅₀ values. Also, the results of investigation showed that the crayfish in *A. leptodactylus* species can be used as a suitable test organism and the selected biochemical markers may also serve well for studies with the aim of determining pesticide pollution in aquatic ecosystems.

Key Words: *A. leptodactylus*, Trifloxystrobin, MDA, SOD, GSH-Px, GSH

1. GİRİŞ

Dünyadaki endüstrileşme ile birlikte toplumların tüketimlerinin giderek artması herkesin şikâyetinde bulunduğu çevre sorunlarını güncel hale getirmiştir. Doğal çevrede, insan ve doğal kaynaklı hasarlar sonucu meydana gelen kirlilik, bugünkü dünyanın karşı karşıya kaldığı büyük bir sorundur.

Günümüzde çevre kirliliğine yol açan etkenler arasında pestisitler önemli bir yer tutmaktadır. Pestisitlerin, bir ekosistem veya bir organizma üzerinde olumsuz etkilerinin saptanabilmesi için ilk önce laboratuvar koşullarında çeşitli organizmalar için olası risk analizlerinin yapılması gerekmektedir. Sucul ekosistemdeki pestisit kirliliği, yaşamlarının önemli bir bölümünü sucul habitatlarda geçirmeleri nedeniyle ortamdaki bütün popülasyonlar için önemli bir risk oluşturmaktadır (Carvalho, 2006; Parlak ve ark., 2009). Son yıllarda tüm dünyada suda yaşayan organizmaların kirlilikten dolayı popülasyonlarında önemli düzeyde azalma olduğu rapor edilmiştir. *A. leptodactylus*’larda sucul ekosistemlerde çevresel kirliliğe maruz kalan gruplar içerisinde bulunan omurgasız hayvanlardandır (Barım ve ark., 2009; Barım ve ark., 2010).

A. leptodactylus, ülkemizde kontrol altında üretilmeyip, istihsalın tümünü doğal ortamlardan avlanan kerevitler oluşturmaktadır. Ülkemiz ihracatı için önemli bir yere sahip olan bu türün miktarı, 1985-1986 yıllarında sularımızda görülen kerevit ve basından ve balıkçıların aşırı ve bilinçsiz avcılık yapmasından dolayı oldukça azalmıştır (Köksal, 1988). Bunun yanı sıra, sularımızın evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenmesi, kerevitlerin et kalitesinin düşmesine de yol açmıştır (Barım ve ark., 2009; Barım ve ark., 2010). Bu nedenlerle; devlet kontrolünde önlemlerin alınması, bilimsel olarak araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Pestisitler temel olarak toprak, yağmur, kar, buz, sis, hava ve suda hemen hemen her türlü çevresel ögede bulunabilmelerinden dolayı, yeryüzündeki bütün organizmalar pestisitlerden etkilenirler. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki bir yasada “ekonomik zehirler” olarak tanımlanan pestisitler, üretildikleri tesislerden veya kullanıldıkları alanlardan farklı yollarla alıcı doğal ortamlara ve hatta çok uzak mesafelere ulaşarak ekolojik problemlere neden olmaktadır (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Bu nedenlerden dolayı, doğal kaynakları kirlüten pestisitlerin bu ortamlardaki yaşamlarını sürdüren organizmalar üzerinde ne tür etkiler oluşturacağının bilinmesi büyük önem kazanmaktadır.

Son dönemde alternatif pestisitler olarak piyasaya sürülen strobilurinler insektisilerden “Trifloksistrobin” yaygın olarak tüm dünyada kullanılmaktadır. Trifloksistrobin (TFS), methyl (E)- methoxyimino- {(E) -a- [1- (a, a, a- trifluorom- tolyl) ethylideneaminoxy]-o-tolyl} acetate (IUPAC), 2000 yılından beri Bayer Crop Science tarafından üretilmektedir. TFS, suda çözünürlüğü 0,61 mg/L’dir ve sıcaklığa bağlı olarak nötralden alkaline kadar değişen çeşitli pH aralıklarında hidrolize olabilir (Belden ve ark.,2010). Bu kimyasalın temel olarak suda degradasyonu çeşitli biyolojik ve fotolitik süreçler sonucu meydana gelmektedir. Trifloksistrobin (TFS)’in, kuşlar, memeliler, arılar, diğer yararlı böcekler ve toprak solucanları için toksik olmadığı düşünülmektedir. Ancak, hedef olmayan sucul canlılar için yüksek düzeyde toksisiteye sahiptir (Uçkun, 2013; Zhu ve ark., 2015).

Çevresel kimyasallara karşı biyolojik sistemde moleküler, hücresel, fiziksel veya davranışsal değişiklikler şeklinde gelişen cevaplar oluşur ki bunlara biyobelirteçlerdir (Parlak ve ark., 2009). En çok kullanılan biyobelirteçler, ksénobiyotiklerin ve metabolitlerinin detoksifikasyonuna katılan biotransformasyon sistemi ve antioksidan enzimleridir (Van Der Oost ve ark., 2003).

Tüm canlılarda olduğu gibi suda yaşayan canlılarda da yaşamın çeşitli dönemlerinde oluşan strese karşılık olarak, vücut dengesinin bozulmasına neden olabilecek serbest radikal oranlarında artış meydana gelir. Serbest radikaller, vücudun normal metabolik aktivitesi için gerekli olan miktardan fazla olursa akut organizmalarda çeşitli bozukluklara yol açarlar. Bu miktarın aşırı çoğalması özellikle protein ve lipid gibi grupların serbest radikallerden etkilenmesine sebep olur. Özellikle lipidlerden hassas olundurlar. Membranda mevcut olan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, bu radikallerle diğer bağlara göre çok daha kolay reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Sonuçta poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak ifade edilen lipid peroksidasyon oldukça zararlıdır ve kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedirler (Winston ve Giulio, 1991; Akkuş, 1995).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların hücrelerde meydana getirdiği biyolojik etkileri önlemek için vücutta çeşitli savunma mekanizması oluşmuştur. Bunlar bilimsel platformda “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak adlandırılır. Bunlar arasında oluşan negatif reaksiyonları pozitif platforma taşımak için katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) önemli yer işgal etmektedir (Gözükara, 2011).

Dünyanın artan nüfusuna göre azalan gıda üretimini arttırmak için genel olarak kullanılan tarımda mücadele yöntemi, kimyasal yöntemlerdir. Bu yöntemler içerisinde özellikle kimyasal mücadelenin temelinde pestisit olan sentetik zirai maddeler vardır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında *A. leptodactylus*'un strobilurinler grubu insektisitlerden Trifloksistrobin'in ticari formunun toksik etkilerinin çeşitli biyokimyasal belirteçler (malondialdehit (MDA), süperoksit düsmütaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon (GSH)) kullanılarak değerlendirilmesi amaçlandı.

1.1. *Astacus Leptodactylus*'un Biyolojisi

1.1.1. Dış anatomisi

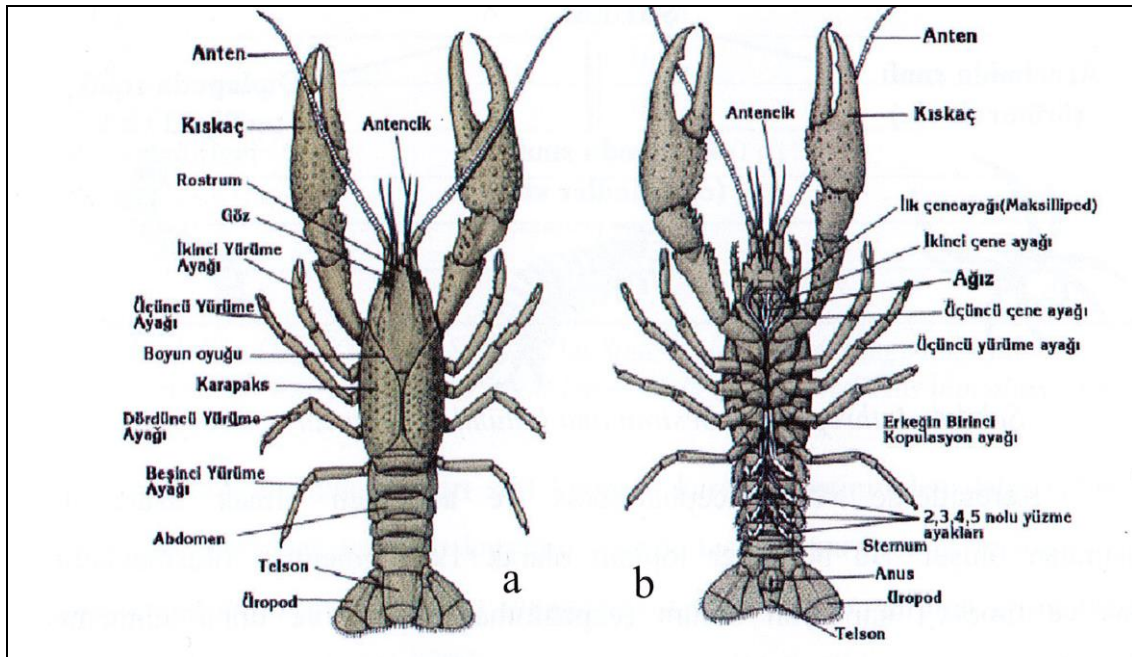
Kerevitler (tatlı su istakozu) sucul ortamda yaşayan, ihtiyaçları olan oksijeni solungaçları ile alan, dayanıklı esnek bir dış iskelete sahip olan omurgasız canlılardır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Astacus leptodactylus*'un dorsalden görünümü

Kerevitlerde vücut, baş ile toraksın birleşmesiyle oluşan cephalotorax (sefalotoraks) ve abdomen olmak üzere iki kısımdan oluşur. Sefalotoraks sert ve bölünmemiş, yapısında kitin ve kalsiyum karbonat bulunan sert bir kabuk ile kaplıdır. Bu kabuk karapaks olarak isimlendirilir. Vücut toplam olarak 19 segmentten oluşmaktadır. Baş kısmında; gözler, 2 çift anten, 2 çift maksil, 1 çift mandibular uzantı ve 3 çift de maksilliped bulunur. İki göz arasından ileri doğru uzayan çıkıntıya rostrum adı verilir. Toraks kısmında periopod olarak isimlendirilen 5 çift yürüme ayakları mevcuttur. Abdomende pleopod olarak isimlendirilen

5 çift yüzme ayakları ve kuyruktan (telson ve üropod) oluşmuştur. Yüzme ayakları kerevit türlerinin teşhisinde, cinsiyet ve cinsi olgunluğun tespitinde kullanılarak dişi erkek ayrımı yapılmaktadır. İlk iki pleopod çifti gonopod olarak adlandırılır. Erkek bireylerde spermin transferini sağlayacak biçimde gelişmiş ve uzun bir yapıya sahiptir. Pleopodlar dişilerde normal yapıdadır ve altı ay boyunca yumurtaları taşımaktadır (Şekil 1.2) (Mazlum ve Yılmaz, 2012).



Şekil 1.2. Kerevitlerin dorsalden (a) ve ventralden (b) vücut kısımlarının adlandırılması (Mazlum ve Yılmaz, 2012)

1.1.2. İç anatomisi ve sindirim sistemi

Kerevitler kompleks ve gelişmiş bir organ sistemine sahiptir. Kerevit tarafından alınan besinler kısaçlar ve çene kısmında bulunan çıkıntılar yardımıyla parçalanır ve ağızdaki diğer uzantılara taşınır. Mandibul, maksil ve maksilliped besinleri tutarak çeneler arasına getirir. Alınan besin ağızda bulunan dişler tarafından parçalanarak kısa ve tüp şeklindeki özofagustan geçerek mideye ulaşır. Mide kardiak ve pilorik olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır ve gastrik mill olarak adlandırılan bir yapı tarafından ayrılır. Kardiak midede besin depolanır ve zaman içinde gastrik mill içinden geçerek işlem görür. Sindirim işlemi pilorik mide ve hepatopankreasda gerçekleşir. Alınan besin gastrik mili geçer geçmez pilorik mideden orta mideye, oradanda abdomen boyunca uzanan ve

telsonda son bulan barsağa geçer. Tüm sindirim kanalı (orta mide dışında) ince bir kitin tabakaya sahiptir ve her kabuk değişiminde dış iskelet ile birlikte atılmak zorundadır. Kerevitlerde mide, mide taşı olarak adlandırılan gastrolitlere sahiptir. Bunlar kalsiyum karbonat içerir ve kardiak midenin her iki yanında bulunur. Büyüme için kabuk değişim esnasında eski kabuktaki kalsiyum karbonatın bir kısmı gastrolitlerde çözünmüş forma getirilerek ağız kısmının ve dış kabuğun oluşumunda kullanılır. Yeni oluşacak kabuğun sertleşmesi için toplam kalsiyum karbonat miktarının 1/3'ü mide, hepatopankreas ve kandan sağlanmaktadır. Hepatopankreas sefalotoraksda yer alır ve üç lobdan (karapaksın ön kısmına doğru çıkıntı oluşturan iki lob ve arkaya doğru uzanan üçüncü lob) oluşur. Proteinaz ve lipaz gibi sindirim enzimlerinin üretildiği, vücut için gerekli olandan daha fazal miktarda alınan besinlerin depolandığı organdır (Holdich ve Reeve, 1988; Conklin, 1995; Chen, 1998; Vogt, 2002).

1.1.3. Solunum sistemi

Kerevitler ihtiyaçları olan oksijeni karapaksın hemen altında bulunan solungaç odacıklarındaki solungaçları ile alırlar. Solungaç odacıkları alta ve yana açılarak suyun girişine izin verirler. Kerevitin bulunduğu ortamda bulunan su, ikinci maksillere bağlı olan çıkıntılarının ileri geri hareketi sayesinde solungaç içine çekilir. Çoğu kerevit türünde 7 adet solungaç çifti bulunmaktadır. Bu solungaç çiftleri, son iki maksilliped çiftine, yürüme ayaklarının zeminine ve ağız kısmına bağlanmıştır. Tüy benzeri kollarla birkaç çukur içinde yer alırlar. Bu çukurlar ise vücut boşluğu ile birleşik durumda bulunurlar. Böylelikle mavimsi renkte olan kalbe dönüş yokundaki kan, taze oksijenin sağlandığı solungaçlara yönlendirilmektedir. Solungaçlardan çıkan kan, perikardial boşluğa girdikten sonra tekrar sirkülasyon için kalbe akmaktadır. Bu akımlar sonucunda vücuttaki tüm hücrelere oksijen sağlanır. Bu oksijenin önemli bir kısmı kerevit tarafından alınan besinlerin parçalanması ve enerjinin açığa çıkarılmasında kullanılır (Atay, 1997; Alpbaz, 2005; Mazlum ve Yılmaz, 2012).

1.1.4. Yaşam alanları

Kerevitler çaylarda, nehirlerde, göllerde ve hatta bataklıklarda yaşarlar. Genel olarak taşların altında ve sığ çukurların içindeki çakıllı diplerde bulunurlar. Taşlıklı, aşırı

derin olmayan alanları, yoğun bitkili, oyuk ve balçiksız suları tercih ederler. Türkiye akarsularında çeşitli bölgelerdeki göl ve göletler ile göller bölgesinde geniş bir alana yayılmıştır. *A. leptodactylus*, iç sularımızda hızlı çoğalma olanağına sahip olan *Astacus astacus* türüyle benzerlikler göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı Türkiye, özellikle Batı Almanya başta olmak üzere 1980’li yıllarda tüm Avrupa ülkelerine yoğun miktarda kerevit eti ihraç eden ülke haline gelmiştir. Ancak balıkçıların bilinçsiz yaklaşımları sonucunda bu önemli potansiyel yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır (Alpbaz, 2005). Kerevitlerin renkleri yaşadıkları bölgeye göre değişmektedir. Doğal yaşam alanına benzeyen çok bitkili, balçıklı ve sazlı yerlerde yaşadıklarından, açık yeşil ve koyu zeytin yeşiline kadar, kumlu ve çakıllı bölgelerde yaşadıklarında, kırsaklarda kahverengi noktalarla bal sarısı renkte, balçıklı diplerde yaşayan örneklerin renkleri ise siyah görünümlü olabilmektedir. Kırsaklarında ve sefalotoraksın üzerinde kahverengi benekler bulunur (Daloğulları, 2012).

Kerevitlerin çevresel koşullara toleransı; türlere göre değişmektedir (Tablo 1.1) (Barım, 2005; Mazlum ve Yılmaz, 2012).

Tablo 1.1. Kerevitlerde su kalitesi değerleri

Suyun Özellikleri		Değerler
Sıcaklık	Büyümleri için	14-22 °C
	Üremeleri için	6-13 °C
pH		6,5-8,5
Oksijen		> 6 ppm
Kalsiyum		> 5 ppm
amonyak		< 0,1 ppm
Sertlik		50-200

1.1.5. Beslenme ve büyümleri

Kerevitler çok yönlü beslenme özelliğine sahip canlılardır. Hem hayvansal kaynaklı (kurtlar, böcekler, molluskalar, zooplankton vb.) hem de bitkisel kaynaklı besinleri değerlendirebilirler. Ayrıca kerevitler mikrobiyal açıdan zengin olan detritus ile beslenme özelliğine sahip canlılardır. Yavru dönemlerinde hayvansal protein değeri yüksek besinleri tercih ederken, erişkin dönemlerinde bitkisel kaynaklı besinleri tercih ederler. Büyüdükçe

özellikle bitkisel kökenli besinlerle beslenen kerevitlerin, temel besin olarak yararlandıkları kaynaklar dekompoze bitki saplarının etrafında bulunan bakteri, mantar ve çeşitli mikroorganizmalardır. Kerevitler su sıcaklığına bağlı olmakla beraber ilkbahar başlangıcından sonbahara kadar çok iyi beslenirler. Yoğun besin aldıkları zaman ise su sıcaklığının 20-25°C olduğu dönemlerdir. Kabuk değiştirme dönemine giren kerevitler bir süre için besin almazlar (Alpbaz, 2005; Barım, 2005).

Kerevitler balıklardan oldukça farklı bir büyüme özelliğine sahiptir. Kabuklu bir canlı olduklarından boyca büyümeleri sadece kabuk değişimi sonrasında olur. Tüm suda yaşayan canlılarda olduğu gibi kerevitlerinde yaşam dönemleri ortamdaki suyun özelliklerine ve mevcut besin bolluğuna bağlı olarak değişir. Kabuk değiştirme dönemlerinde bu canlılar gayet sessiz ve sakin döneme girerek yem almazlar ve renklerinde değişimler olur (Atay, 1997). Göllerde yaşayan kerevitler ortam şartlarına adapte olmuş ve yeterli besin ile 3. yılın sonunda 8,00-9,50 cm uzunluğa ulaşınca cinsi olgunluğa erişirler. Gelişebilmeleri için uygun ortamın olmadığı sularda kerevitler yeterince besin bulamadıklarından geç kabuk değiştirirler (Atay, 1997; Alpbaz, 2005).

Kerevitin dış kabuğu endokutikula, ekzokutikula ve zarımsı bir tabakadan oluşan prokutikül ve epikutikülden meydana gelir. Epikutikül kitin içermez. Yapısında çok az yağ vardır. Kerevitlerin su kaybından korunması, dış kabuğun kalınlığı ve lipoproteinlerin tabakalaşması ile sağlanır. Kabuğun yapısında sertleşmeyi sağlayan CaCO₃, kitin gibi maddeler bulunur (Reynolds, 2002).

1.1.6. Üremeleri

Kerevitler ayrı eşeyli hayvanlar olup testis ve ovaryumları çift olarak bulunur. Yumurtlamak suretiyle çoğalırlar. Bu canlıların çiftleşmesi 8-9,5 cm total boyda ve 3-4 yaşında gerçekleşir. Genital açıklık; erkekler de V. çift pleopodların koksa denilen parçasının iç yüzeylerine, dişilerde III. çift pleopodlara açılır (Kumlu, 1998; Reynolds, 2002). Erkek ile dişi çiftleştikten sonra erkeğin spermatoforları dişinin ventral yüzeyinde depolanır. Yaklaşık olarak iki hafta sonra yumurtalar dişi tarafından yumurtlanır. Bu yumurtaların döllenmesi dışarıda ve glair adı verilen mukus içerisinde gerçekleşir (Reynolds, 2002). Tatlı su istakozlarında yumurta verimliliği temel olarak; türe, besin durumuna ve çevresel faktörlere göre değişmektedir. Bu canlılarda erkek ve dişinin çiftleşmesi Ekim-Kasım aylarında ve su sıcaklığı 7 ile 12 °C arasında iken oluşabilir.

Yumurtaların gelişimi Ocak-Haziran boyunca devam eder. Yumurtalarını su sıcaklığına bağlı olarak beş altı ay, daha soğuk ortamlarda ise altı-yedi hatta sekiz ay taşıyabilirler (Barım, 2005).

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller kısa ömürlü, kararsız, düşük molekül ağırlıklı bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan çok etkin moleküllerdir. Oldukça reaktif özelliğe sahip olan radikaller organik ve inorganik moleküller halinde bulunabilir.

Radikal grubunda birçok atom bulunmasına rağmen halojen atomları, oksijen metabolizmasının ara ürünleri olan oksijen çeşitleri, Cl, Br gibi atomlar, N^+ , K^+ gibi alkali metal atomları, NO, NO_2 gibi atom kombinasyonları daha yaygın radikallerdir. Özellikle oksijen radikalleri canlılığın devamı için gerekli olup birçok enzim tepkimeleri ve biyolojik oluşumlar için gereklidir (Gökalp ve ark., 1992; Akkuş, 1995; Memişoğulları, 2005).

1.2.1. Serbest radikal kaynakları

Organizmadaki serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından oluşturulabilir. Normal yaşam süresi içerisinde serbest radikaller hücrede ve çevrede sürekli olarak üretilir. (Mercan, 2004; Karabulut ve Gülay, 2016).

1.2.2. Reaktif oksijen türleri

Süperoksid (O_2^-): Bu radikal moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Bu radikalın hücrede moleküler düzeyde önemli özelliği, sekonder olarak ürettiği radikallerdir. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan O_2^- mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'in okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'e okside olması reaksiyonları ile üretilir. Farklı oksidaz tarafından da üretildiği belirlenmiştir. Sinlet oksijen radikalleri ($O_2\cdot$) genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde, ortamın pH sına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir ve perhidroksi

radikali ($\text{HO}_2^\cdot$) ismini alır. Süperoksit, bir serbest radikal olmasına rağmen, kendisi direkt olarak fazla miktarda zarar vermez. En önemli etkisi, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit seviyesi ortamda yükselirse süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülerek miktarın indirgenmesi yoluna gidilir (Mercan, 2004; Memişoğulları, 2005).

Hücrel reaksiyonlar esnasında iki süperoksit radikali birbirleriyle etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri redüklenir. Bunun sonucunda ise H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (Gözükara, 2011). Dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkimeler sonucunda süperoksit radikalleri ortamdan temizlenir (Akkuş, 1995; Gözükara, 2011).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2): Çeşitli tepkimeler esnasında ortamda bulunan doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Bu esnada peroksit molekülü iki H molekülü ile birleşirse H_2O_2 oluşur. Oluşan H_2O_2 ortamdaki süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak ta üretilebilmektedir. Hücrede oluşan H_2O_2 aslında radikal değildir ve bu nedenle kendi başına hücreye zarar vermez. Ancak üretildiği bölgede membranları geçer, sitozole diffüze olur ve uzun ömürlü bir oksidan olarak süperoksitin ulaşmadığı zarlarda korunan yapılara hemen ulaşabilir. Bu tür membranlarda süperoksitle reaksiyona girer ve etkin reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak için yıkılabilir. Moleküller oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron (é), süperoksitin ise 1 é alması ile H_2O_2 oluşmaktadır (Winston ve Giulio, 1991; Gözükara, 2011).

Hücrelerde biyolojik sistemlerde H_2O_2 asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Tepkimeler esnasında iki süperoksit molekülü bir proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.

Serbest radikal tanımına uymayan H_2O_2 yüksüz olduğundan dolayı membranları difüzyonla kolayca geçmesine rağmen süperoksit (-) yüklü olduğundan anyon kanalı bulunan membran olmadıkça (anyon kanalı bulunan tek membran eritrosit membranıdır) membranlardan difüzyonu oldukça zordur. Bu nedenle H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin girmediği membranlara da girer ve büyük oranda hasar oluşturabilir. Hidrojen peroksit süperoksit radikali ile de tepkimeye girer ve hem reaktif hem de zarar verici oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşur.

Süperoksit ve hidrojen peroksit, metal katalizörlerinin bulunmadığı durumlarda kolayca ortamdan uzaklaştırılarak zararsız hale getirilebilir. Bazı bakteri ve hayvan

hücreleri, çeşitli tepkimeler ile az miktar H_2O_2 ile hasar görürken bazıları fazla miktarda H_2O_2 üretebilir. Hücrelerde oluşan H_2O_2 daha çok katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-PX) tarafından parçalanarak detoksifiye edilir (Akkuş, 1995).

Hidroksil Radikali (OH): Bilinen en aktif radikaldır. Birçok reaksiyonla radikal üretimine katkı sağlamaktadır. Hücrelerde bulunan temel bazı biyokimyasal maddelerin büyük bir kısmıyla reaksiyona girebilir. Bu tepkimeler sonucu hidroksil radikali oluşabilir. Ortamda oluşan enerji hücre suyu ile değerlendirilir. Böylece kovalent bağ kaybolur. OH^* radikali, kısa yarı ömürlü ve oldukça reaktif olan oksitleyici ajandır (Akpoyraz ve Durak, 1995; Memişoğlu, 2005).

Hücrelerde oluşan serbest radikal tepkimeleri büyük oranda, hidroksidin paylaşılmamış elektron içermesi elektron alma ilgisinden kaynaklanabilmektedir (Mercan, 2004; Memişoğulları, 2005). Fizyolojik şartlarda OH^* radikali oluşması için O_2^{*-} radikalinin elektronu H_2O_2 ' ye aktarılarak süperoksit radikalini indirgemesi, süperoksit radikallerinin kendiliğinden dismutasyonuna göre oldukça yavaştır. Çok zayıf bir asit özelliğe sahip olan OH^* radikalinin, biyolojik sistemlere fizyolojik ve patolojik etkileri vardır (Akkuş, 1995; Gözükara, 2011).

1.2.3. Serbest radikallerin yararları

Metabolik aktiviteler neticesinde düşük yoğunlukta olduklarında reaktif oksijen türleri ile reaktif nitrojen türlerinin yararlı etkilerinden söz etmek mümkündür. Bunun yanı sıra fagositoz aracılığıyla enfeksiyonlara karşı savunma, sitokrom p450 tarafından ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, mitokondride ATP üretimi, hücre büyümesi ve düşük konsantrasyonda mitojenik yanıtlara neden olma gibi hücresel faaliyetler de sayılabilir. Ayrıca metabolik aktiviteler esansında düşük yoğunluklarda üretildiklerinde dahi bunların, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, intrasellüler depolardan kalsiyumun salınımı, bazı sitokinler ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu gibi hücresel sinyaller üzerine önemli rolleri olduğundan bahsedilebilir. Bunların dışında ROS; tiroksin ve prostaglandin gibi moleküllerin biyosentezine katılıp bu işlemlerin gerçekleşmesini hızlandırır. ROS hücre ortamında çözülerek guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesinde ve gen transkripsiyonu gibi hayatsal faaliyetlerde kullanılır. Özellikle endotel hücreleri tarafından kullanılan NO lökosit adezyonu, platelet agregasyonu, anjiogenesis, trombozis ve damar düz kaslarının kan basıncını düzene bırakılabilmesi için oldukça gereklidir.

Ayrıca, nöronlar tarafından üretilen NO önemli bir transmitter maddedir ve nöral plastisite için temel öge iken, makrofajlar tarafından üretilen NO immun yanıt oluşturmak için gerekli bir mediatördür. Bunlar süperoksit ve H_2O_2 ikinci haberciler gibi hareket edebilir. Fakat hücresel aktiviteler sonucunda bu serbest radikallerin birikimi artıkça zararlı etkilerinin ortaya çıkması kaçınılmazdır (Devasagayam ve ark., 2004; Fang ve ark., 2002; Valko ve ark. 2007).

1.2.4. Serbest radikallerin zararları

1.2.4.1. Membran lipidleri üzerine etkileri

Lipid peroksidasyon (LPO) hücre membranında bulunan fosfolipit, gliserit, glikolipit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitleri (PUFA)'nin serbest oksijen radikalleri tarafından aldehitler, peroksitler, alkoller, hidroksit yağ asitler, pentan ve etangibi çeşitli ürünlere yıkılma reaksiyonudur (Kavas, 1989; Winston ve Giulio, 1991; Mercan, 2004).

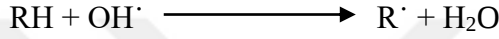
Hücre membranlarının en önemli biyomolekülleri lipid ve proteinlerdir. LPO, membran lipidleri kadar membran proteinlerini de hasara uğratabilirler. Hayvan membranlarında, baskın lipidler, gliserol içeren fosfolipidlerdir (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Oksijen molekülünün lipidlere karşı yüksek duyarlılığı vardır. Membrandaki molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra öncelikle eritrosit zarındaki lipidler reaksiyona girerek ondan sonra plazmadaki lipoproteinlerde çözünmektedir. Daha sonra hücrelerde kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlar esnasında dokularda bulunan PUFA'lardaki çift bağlara oksijen bağlanarak LPO kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir (Winston ve Giulio, 1991; Akkuş, 1995).

Lipid peroksidasyon hücre membranlarında kendini devam ettiren çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Her hücrede direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir (Mercan, 2004; Karabulut ve Gülay, 2016).

1.2.5. Lipid peroksidasyon oluşumu

Hücre membranlarında reaktif serbest radikallerin PUFA'dan bir hidrojen atomunu çıkarması ile reaksiyonlar başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde reaksiyonlardaki radikallerin $O_2^{\cdot-}$ ile $\cdot OH$ olduğu kabul edilmektedir. Membranda oluşan $O_2^{\cdot-}$ ve diğer metabolik yollardan ileri gelen H_2O_2 , $\cdot OH$ 'ne dönüştükten sonra LPO'na katılmaktadır. Reaksiyonlar sonucunda oluşan radikal, lipid moleküllerin bir H atomu çıkartarak karbon merkezli lipid radikalinin ($R^{\cdot}$) oluşmasına yol açmaktadır ((Mercan, 2004; Memişoğulları, 2005; Karabulut ve Gülay, 2016).



Lipid peroksidasyonun zincir aşamasında H atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asidi radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek $ROO^{\cdot}$ oluşturmaktadır. Membranda oluşan $ROO^{\cdot}$ oldukça yoğun reaksiyonlara girer. Böylece farklı bir yağ asidi molekülü ile yeni bir $ROOH$ ve yeni bir $R^{\cdot}$ (karbon merkezli radikal) oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonunda oluşan $R^{\cdot}$ yeniden oksijen ile birleşir ve RH 'dan yeniden bir H^+ ayrılmasını sağlar. Birçok membran reaksiyonunda bu şekilde oluşan $ROOH$, $RO^{\cdot}$ ve $\cdot OH$ verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan yeni radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan $R^{\cdot}$ radikallerini oluştururlar. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak kendini devam ettiren yeni radikallerin oluşmasına neden olurlar (Gözükara, 2011; Karabulut ve Gülay, 2016).

Hidroperoksitler ve bunlara bağlı olarak oluşan serbest radikaller ($ROO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$ ve $R^{\cdot}$) ya birbirleri ile reaksiyona girerek inaktif kondenzasyon ürünlerini verirler ve zincir uzaması durdururlar yada zincir uzamasının durması değişik yapı ve yetenekteki bazı bileşikler tarafından gerçekleştirilir. Bu bileşiklere ise oksidasyona karşı oldukları, bu maddelerdeki istenmeyen değişiklikleri önleyip ortadan kaldırdıkları için antioksidan madde adı verilir (Gözükara, 2011). Vücutta oluşan metabolik aktiviteler esnasında, membrandaki antioksidan korumanın azalması sonucu LPO'nun başlama ve gelişme oranı hızla artmaktadır. Membranlardaki LPO miktarı tür, cinsiyet ve doku özelliğine göre değişmektedir (Barım, 2005).

1.2.6. Protein, dna ve karbonhidratlar üzerine etkisi

Proteinlerin serbest radikaller tarafından etkilenme oranları amino asit içerikleri ile tespit edilebilir. Doymamış bağlara ve sülfürlü moleküllere radikallerin oldukça yüksek duyarlılığı olduğundan bazı amino asitleri içeren proteinler radikallerle daha kolay reaksiyona girer (Devasagayam ve ark., 2003).

DNA, OH[•] gibi serbest radikaller ile reaksiyona girerek hidrojen atomlarının kaybına veya ilavesine sebep olabilir (Fang ve ark., 2002; Devasagayam ve ark., 2004; Sarma ve ark., 2010; Karabulut ve Gülay, 2016).

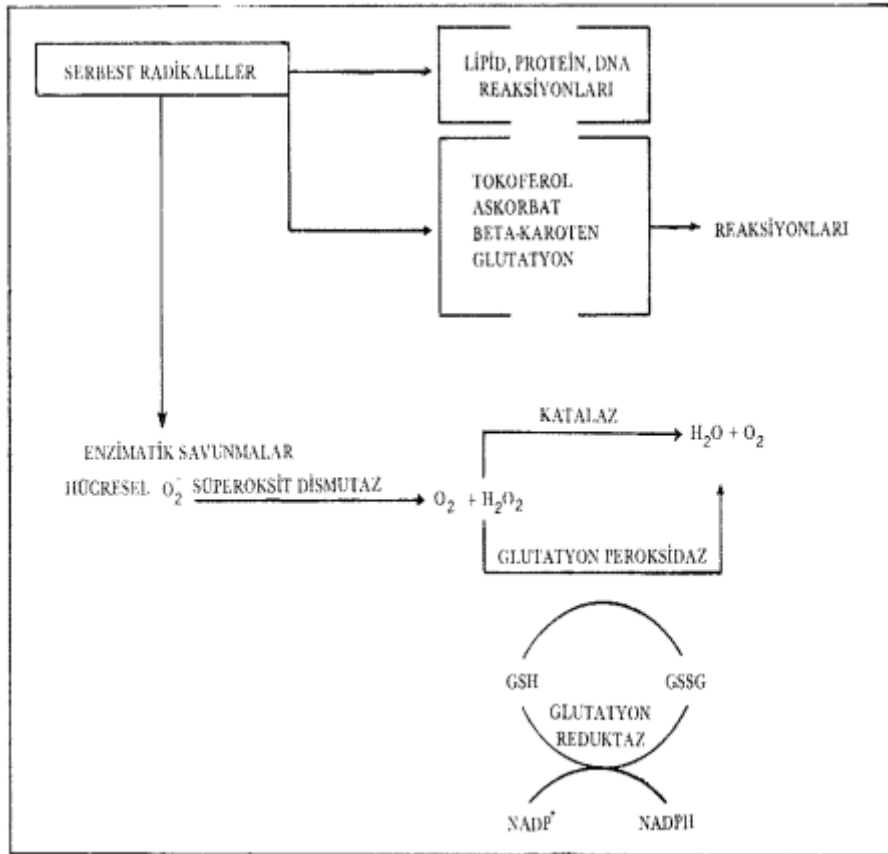
1.2.7. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma

Vücutta çeşitli tepkimeler sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği biyolojik etkileri önlemek için hücrelerde “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinen çeşitli savunma mekanizmaları oluşmuştur. Bunlar sistem serbest radikallerin üretilmesi ile yok edilmesi arasındaki dengeyi sağlarlar (Tablo 1.2) (Akkuş, 1995; Gözükara, 2011).

Tablo 1.2. Antioksidanlar (Akkuş, 1995)

Enzimatik antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz	Süperoksit anyonunu detoksifiye eder
Sitokrom oksidaz sistem	Hücredeki O ₂ 'nin %95-99'unu detoksifiye eder
Glutasyon peroksidaz	Hidrojen peroksiti detoksifiye eder
Katalaz	Hidrojen peroksiti detoksifiye eder
Non-enzimatik antioksidanlar	
Lipitte çözünenler	
β-karoten	A vitamini prekürsörü
α-tokoferol	E vitamini
Suda çözünenler	
Glutasyon	
Askorbik asit	C vitamini
Bilirubin	O ₂ ^{•-} , OH [•] temizleyicisi
Ürat	O ₂ ^{•-} , OH [•] temizleyicisi
Sistein	O ₂ ^{•-} , OH [•] temizleyicisi
Albumin	LOOH, HOCl temizleyicisi
Transferrin	Dolaşımdaki demiri bağlar
Seruloplazmin	SOD'a benzer muhtemel mekanizma
Ferritin	Doku demirini bağlar

Vücutta çeşitli tepkimelerle oluşan radikalller çeşitli temizleyicilerle ortamdan uzaklaştırılır. Serbest Radikal temizleyiciler içinde yer alır. Bu gruptaki bir dizi molekül, membranda, lipofilik serbest radikalleri daha az toksik forma indirger. Özellikle lipid peroksidasyon döngüsü içerisinde vitamin E superoksit, hidroksil ve lipid peroksi radikallerini bu şekilde etkiler (Şekil 1.3) (Gözükara, 2011).



Şekil 1.3. Serbest Radikal Mekanizması (Kavas, 1989)

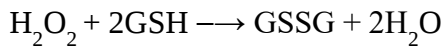
Serbest radikalleri ortamdan temizleyen diğer bir grup da sitoplazmik temizleyicilerdir. Bu temizleyicilerden glutatyon (GSH), hidrojen peroksiti, lipid peroksitleri, askorbat ve serbest radikalleri indirgeyebilir (Şekil 1.3). Glutatyon peroksidazlar adı altında bir grup ise enzim peroksit redüksiyonunu katalize eder. Bunların peroksitlerle ve disülfidlerle reaksiyonundan glutatyon disülfid oluşur. Ayrıca glutatyon redüktaz, kofaktör olarak NADPH'ı kullanarak disülfidleri indirger. Bu nedenle hücre serbest radikal stresinin bir sekonder göstergesi de GSSG redüksiyonu için gerekli olan NADPH'ın depleksiyonudur. Hücre transhidrojenazlar, özellikle NADH ve NADPH'ı dengede tutmaya çalışır; ortamda bir serbest radikal stresi olduğu durumlarda, hücre

içindeki bütün indirgenmiş piridin nukleotidlerinin konsantrasyonu belirgin olarak azalır ve bu nedenle birçok metabolik olayın integrasyonu bozulur. Hücrel oksidan stresin bir diğer göstergesi ise intrasellüler GSSG'in yükselen konsantrasyonudur. Çünkü birçok araştırmada, bu bileşik tiol-içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerine zararlı etkilerde bulunabilir. Okside glutatyonun (GSSG) eritrosit dışına aktif transportu glutatyon oksidanları ile ilgili olup organizmadaki pek çok hücrenin eritrositler gibi GSSG'i temizleyici mekanizmalara sahip oldukları gösterilmiştir (Kavas, 1989).

Radikallere karşı hücrelerde oluşan önemli bir grup da enzimatik serbest radikal temizleyicilerdir. Katalaz ve peroksidazlar hidrojen peroksidin konsantrasyonunu düşürmeye yardım ettikleri için serbest radikal temizleyicileri olarak kabul edilirler. Böylece, hidrojen peroksidin sitotoksik gücü büyük ölçüde intrasellüler katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin ve Superoksit dismutazlar (SOD), dismutasyon reaksiyonunda etkili metalloprotein yapısında enzimlerdir (Mercan, 2004; Karabulut ve Gülay, 2016).

Radikaller üzerine etkili 3 tür SOD vardır. İlki mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD sonuncusu ise Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir (Gözükara, 2011).

Enzimatik antioksidanlardan biri de glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'dir. Bu enzim redükte glutatyonu yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur. Eğer ortamda vitamin E yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Özellikle eritrositlerde çok kuvvetli bir antioksidandır. Bu enzimin yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir (Gözükara, 2011).



1.2.8. Toksikolojide serbest radikaller

Aminotriazol, asetaminofen gibi ilaçlar, demir, bakır gibi metal iyonları, ozon, nitrik oksit gibi kirleticiler, ultraviyole ışık, x-ray gibi radyasyon kaynakları serbest radikal oluşumuna sebep olan toksik özelliğe sahip gruplardır. Yapılan araştırmalar sonucunda; oksijen kökenli serbest radikallerin, ilaç ve toksinle oluşan reaksiyonlar, kursun zehirlenmesi, ağır metal nefrotoksitesisi, aminoglikozit nefrotoksitesisi, karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefritis, iskemi, hepatitis B ve reperfüzyon, Vit E eksikliği, kanser, hiperoksi, amfizem bronkopulmoner displazi, pankreatitis, arteroskleroz

ve romatoid artrit gibi pek çok hastalığın patogenezisinde etkili oldukları öne sürülmektedir (Mercan, 2004).

1.3. Pestisit

Amerika Çevre Koruma Dairesi (U.S. Environmental Protection Agency, EPA)' ne göre tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen mantarlar, haşereler, kemiriciler ve yabancı otlar gibi zararlılara karşı kullanılan gelişim önleyici, yok edici, sayılarını azaltıcı ya da uzaklaştırıcı etkiye sahip madde ya da madde karışımları olan biyolojik, fiziksel veya kimyasal ajanlara pestisit denir. Latince kökenli olan pestisit kelimesi, *pest* = zararlı, *cide* = öldürücü anlamına gelmektedir (Klaassen, 2001). Dünyada farklı formülasyona sahip, sayısız kimyasal madde her yıl yaklaşık 3 milyon ton civarında üretilmekte ve 30 milyar dolarlık bir ticari hacim oluşturmaktadır (Meister, 1999; Uçkun, 2013). Türkiye'de pestisit kullanımı tüm dünya genelinde olduğu gibi giderek artmaktadır (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Türkiyede 2014-2018 yılları arasında pestisit kullanımı (URL-1, 2019)

2014		2016		2018	
Kullanılan pestisit miktarı	Toplam tarım alanı	Kullanılan pestisit miktarı	Toplam tarım alanı	Kullanılan pestisit miktarı	Toplam tarım alanı
39723 ton pestisit	23941 bin hektar	50054 ton pestisit	23711 bin hektar	60020 ton pestisit	23200 bin hektar
2014' e göre %25 artış		2014' e göre %50 artış			

Dünya nüfusunundaki hızlı artış ve tarım arazilerinin kısıtlı olması tarımsal mücadele konusunu gündeme getirmiştir. Bu mücadele bitkilerin hastalık zararlı ve yabancı otların etkilerinden korunarak, elde edilen ürünlerin miktar ve kalitesini arttırma prensibine dayanmaktadır. Bu mücadelede kullanılan bir grup tarım ilaçları da pestisitlerdir (Parlar, 2009).

İnsanlık tarihinde bilinen ilk pestisit kullanımının, Mezopotamya'da yaklaşık 4500 yıl önce antik Sümer'de fungusit olarak kullanılan elemental kükürt tozudur. Bu bileşikler günümüzde de meyvecilikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak zaman içerisinde bu

doğal bileşiklerin maliyetlerinin pahalı olması ve etkinliklerinin daha arttırılmak istenmesinden dolayı sentetik bileşiklerin kullanımı gündeme gelmiştir. Özellikle 1940'lı yılların ortalarında, böceklerle karşı savaşta yaygın olarak kullanılan pestisitlerin sayısı ve kompleksliği hızla artmıştır. Sentetik bileşikler içerisinde 1940'lı yılların sonunda özellikle insektisit olan diklordifenil trikloretan (DDT) ve heksaklorsikloheksan ile hormon karakterli olan herbisitlerden diklorfenoksi asetik asit (2,4-D) ve 2-metil-4-klorofenoksiasetik asit kullanılmaya başlanmıştır (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

1.3.1. Pestisitlerin çevre üzerine etkisi

Bitkisel ve hayvansal ürün miktarını arttırmak için kullanılan pestisitler çevreye yayılım göstererek insanların tüm yaşam alanlarına etki etmektedir. Bu etkileri hedef dışı organizmalara, toprağa, yüzey ve yer altı sularına direkt bulaşma, toprağa bulaşma, doğrudan bulaşma şeklinde olmaktadır. Ayrıca ortamdaki kalıntılar ya da farklı maddelerle temas ederek oluşturulan kalıcı bileşikler nedeniyle aynı ortamlara yine etki etmektedir. Bu tür kimyasalların kullanımı sonucunda %0,1'den az bir miktarı hedef organizmaya ulaşırken, kalan miktarı ekosisteme karışmakta ve ekosistemde süregelen dengelerin bozulmasına neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2005). Kullanılan pestisitlerin kullanıldığı ortam şartlarında taşınımı ve yeraltı sularına karışmasında en önemli etken, kimyasal ve fiziksel özellikleridir. Pestisitlerin yağda çözünürlük derecesi, toprak tarafından tutulması ve hayvanlardaki birikimini belirleyen faktörlerden biridir. Özellikle suda çözünürlüğü ve buharlaşma yeteneği yüksek olan pestisitler kolaylıkla su döngüsüne girebilmekte, çözünürlüğü düşük ve yarı ömürleri yüksek olan pestisitler ise toprak partiküllerine tutunarak uzun süre burada kalabilmekte ve zamanla ortamda birikmektedirler (Tosun ve ark., 2001).

Türe bağlı olarak değişmekle beraber bazı pestisitler, kalıcı veya parçalanmaya dirençli özelliktedirler. Bu nedenle, fazla miktarda daimi olarak kullanılmaları durumunda, ekosistemin biyotik ve abiyotik bileşenlerinde ekosisteme girdikleri andan itibaren giderek artan miktarlarda akümüle edilirler. Bu akümülyasyon sonucunda ise, beslenme yoluyla canlılara geçerek besin zincirinin en tepesindeki insanlara kadar ulaşarak en fazla birikimi insanlarda yaparlar. Örneğin, zararlı böceklerle karşı kullanılan DDT'nin, yoğun kullanıldığı bölgelerde, besin piramidinin en alt tabanındaki canlıdan en tepesindeki canlıya doğru giderek artan oranlarda birikim yapmış, deniz ve göllerdeki fitoplanktonların

fotosentez yapmalarını engelleyerek birincil üretimi azaltmıştır. Besin zincirinde üstlerde bulunan yırtıcı kuşların üremesini engellemiştir. Bu sırada DDT'ye karşı direnç kazanan böcek türleri daha güçlü bir şekilde çoğalarak daha çok zarar vermeye başlamıştır (Serrano ve ark., 2004).

Pestisitler, kimyasal yapıları gereği toksik olduklarından bazı yardımcı maddeler ile karıştırılarak kullanılırlar. Böylece oluşturulan “Formülasyon” denen bu fiziksel karışım içinde belirli bir oranda bulunan pestisit, “etkili madde” veya “aktif madde” olarak adlandırılır. Bu tür formüllerin oluşumunda bulunması gereken özellikler standart metotlar geliştirilerek WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve FAO tarafından belirlenir. Genellikle aktif madde, yardımcı maddeler, emülgatörler ve dolgu maddelerinden oluşmaktadır (Cecchine ve ark., 2000).

Türkiye’de tüketilen 40 bin ton tarım ilacının, %47’sini insektisitler, %24’ünü herbisitler, %16’sını fungusitler, %13’ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır. Ülkemizde zirai ilaç olarak ifade edilen pestisit kullanımı son on yıllık süreçte 54 bin tondan %27 oranında azalarak 40 bin tona düşmüştür. Bu pestisitlerin yıllık satış tutarı da yaklaşık 230-250 milyon dolardır (Canik, 2012; Uçkun, 2013).

1.3.2. Pestisitlerin Su Canlıları Üzerine Etkisi

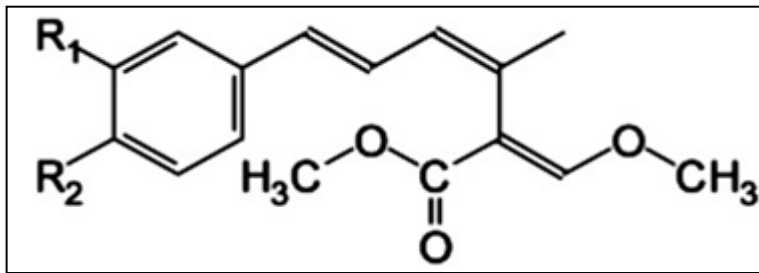
Ekosfere kirletici maddelerin girişi bir süre sonra çevrede eşit olamayan bir dağılımla yayılacaktır. Örneğin, biyolojik sistemlerde, çeşitli tepkime basamaklarında ve farklı vücut kısımlarında dağılım olacaktır. Örneğin, su-balık, balık vücudunda kan-yağ dokusu, mikrosom-sitosolarası sıvısında geçiş ve dağılım farklı olmaktadır. Bu tür kirletici maddeler canlı içinde dağılmadan önce hücre zarını geçerek iç kısma yönelirler. Bu sebeple hücre zarı kirletici maddelerin ve diğer kimyasalların hareketini kontrol etmede yaşamsal önem gösterirler. Eğer ortamda bulunan kimyasalın yağda çözünme kapasitesi çok düşük ise hücreye, hücre zarında çözünerek pasif taşınım yoluyla yada hücre zarından geçemeyecek kadar büyükse filtrasyon yoluyla geçer. Aktif taşıma sisteminde ise bir taşıyıcı bulunmaktadır. Bu yolla kirletici maddenin kimyasal formu makromoleküler bir taşıyıcı ile hücre zarının iç kısmına doğru hareket eder. Bu hareket sistemi ile kimyasal maddenin hem hücre içine alınmasını hemde hücreden dışarı atılmasını sağlar. Bu kimyasallar sudan doğrudan yada besinler yoluyla alınarak doğal besin zinciri içinde bir trofik seviyeden diğerine transfer olur (Parlar ve ark., 2009). Genel olarak, canlılar

kimyasal maddeleri 3 farklı yoldan absorbe ederler. Bunlar; solunum yoluyla, deriden absorbsiyon ya da sindirim sistemi yoluyla (besin) olur.

1.3.3. Strobilurinler

Doğal ortamda bulunan strobilurinler, methyl (E)-3-methoxy-2-(5-phenylpenta-2,4dienyl) acrylate yapısında olup, bu maddenin çeşitliliğini, 3. ve 4. pozisyondaki aromatik halka değişimleri sağlamaktadır (Şekil 1.4). Temel yapı baz alınarak oluşturulan sentetik strobilurinler, yan zincir modifikasyonu ile geliştirilmiş fotostabilite özelliği kazandığından, β -methoxyacrylate farmakoforu sayesinde doğal strobilurinler gibi biyolojik aktivite gösterirler (Hüter, 2011).

Tarımsal fungusitlerin önemli bir sınıfı olan strobilurinlerin gelişimine β -metoksiakrilik asidin doğal fungisidal türevleri öncülük etmiştir. Bu maddeler *Strobilurus* cinsi mantarlardan gelmektedir. Strobilurin A ve oudemansin A örnek olarak verilebilir. Doğal strobilurinler, *Basidiomycetes* sınıfına ait *Strobilurus tenacellus* ve *Oudemansiella mucida* türlerinde tanımlanmaktadır. Bu tür doğal strobilurinler, bakterilere karşı inaktif iken, maya ve filamentli funguslara karşı oldukça aktiftirler (Balba 2007; Bartlett ve ark., 2002).



Şekil 1.4. Strobilurinlerin temel yapıları (Uçkun, 2013)

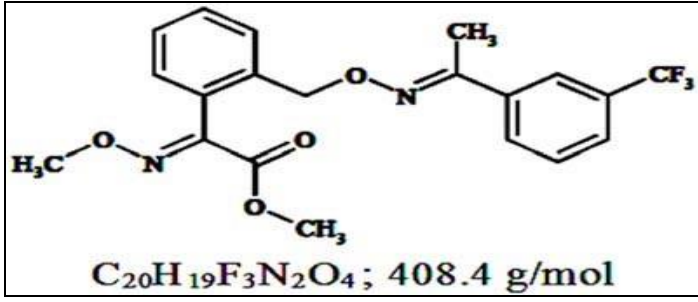
Oldukça geniş spektruma sahip bu tür fungusitler, yüksek seçici toksisiteleri ve verimi artırmadaki performansları ile diğer fungusitlere göre önemli avantajlar sağlarlar. İlk kez strobilurin grubu fungusitlerin satışları 1996 yılında azoksistrobin ile başlamıştır. (Barlett ve ark., 2002). Strobilurin sınıfına ait kimyasallar etkilerinin fungal yaşam döngüsünün ilk basamağı olan sporların çimlenme aşamasında gösterirler. Bu tür maddeler, mitokondri iç membranında bulunan ve elektron taşıma sisteminin bir elemanı

olan sitokrom *bc₁* enzim kompleksinin kinol oksidasyon bölgesine bağlanarak sitokrom *c₁* ve sitokrom *b* arasındaki elektron transferini bloke ederek, redükte NADPH oksidasyonunu ve ATP sentezini engelleyerek funguslarda hücresel solunumu sekteye uğratır. Böylece enerji üretimini durdurarak, fungusun ölümüne neden olur (Bartlett ve ark., 2002; Balba 2007; Fernández-Ortuño ve ark., 2010).

Sentetik strobilurin grubu fungusitler, genel olarak düşük toksisiteye sahiptir. Bunlar sınırlı dozlarda kullanıldıklarında kuşlar, memeliler ve arılar için toksik değildir. Ancak sucul canlılar için türe bağlı olarak farklı toksisite göstermişlerdir (Bartlett ve ark., 2002).

1.3.4. Trifloksistrobin

Bayer Crop Science tarafından 2000 yılından beri üretilmekte olan Trifloksistrobin (TFS), methyl (*E*)-methoxyimino-{(E)-a-[1-(a,a,a-trifluorom-tolyl) ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate (IUPAC), suda çözünürlüğü 0.61 mg/L olup, sıcaklığa bağlı olarak nötralden alkaline kadar birçok pH aralığında hidrolize olur. (Şekil 1.5). Diğer strobilurin grubu fungusitler gibi TFS’inde sudaki degradasyonu temel olarak biyolojik ve fotolitik süreçler sonucu olmakta, hedef olmayan sucul canlılar için yüksek düzeyde toksisite göstermektedir. TFS’nin çevredeki yarılanma ömrü suda 2, toprakta 15-55 gündür. Bu madde degradasyon sonrası birinci dereceden asit metabolitine (CGA321113) ve bir seri izomere dönüşür. Topraktaki yarılanma ömrü uzun süre alan (301 gün) CGA-321113, suda çözünür (30,9 ppm) ve taşınabilir özellik gösterir. Yer altı sularına ulaşabilme potansiyeli olan CGA321113, hidrolize dirençlidir ve yaklaşık 1 m derinlikteki toprak profilinde saptanmıştır. Bu madde, yüzeye püskürtme, atmosferik taşınım, yağmur suları ve uygulama sırasında arazi üzerinde bulunan hayvanların hareketleri gibi yollarla su ortamlarına taşınır. Böylece sucul organizmalarda, TFS’in suda çözünür bir metaboliti olan [(E, E)-trifloksistrobin asit]’e maruz kalabilirler (Banerjee ve ark., 2006; EPA, 2002).



Şekil 1.5. Trifloksistrobinin moleküler yapısı (Uçkun, 2013)

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyal

2.1.1. Araştırma süresi ve yeri

Araştırma 01 Temmuz-30 Ağustos 2019 tarihleri arasında yapıldı. Bu araştırmanın toksikoloji kısmı Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim Tesisi'nde, doku analizi kısmı ise Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı.

2.1.2. Araştırmada kullanılan pestisit

Araştırmada strobilurin fungusitlerden Trifloksistrobin (TFS) (methyl (E) – methoxyimino-{(E) – a- [1- (a, a, trifluoro – m – tolyl) ethylideneaminoxy] – o – tolyl}acetate) kullanıldı. Bu pestisit türü FLİNT WG 50 ticari adı ile Bayer Türk tarafından üretilen ve pazarlanan bir preparatdır.

2.1.3. Kerevitlerin sağlanması

Araştırmada kullanılan kerevitler (*A. leptodactylus*) Keban Baraj Gölü Aydıncık yöresinden avcılıkla elde edildi.

2.1.4. Kerevitlerin yem bileşimi

Araştırmada, kerevitleri ortam şartlarına adepte etme döneminde kullanmak üzere Cip Balık Üretim Tesisinde pelet yem yapıldı. Bu yem Barım (2005), tarafından oluşturulan ve kerevit gelişiminde olumlu sonuçların alındığı formüle göre düzenlendi (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Araştırmada kullanılan yemin yapısına giren yem maddelerinin bileşimi (%)

Yem Maddeleri	%
Balık Unu	35,9800
Buğday Unu	19,3000
Soya Küspesi	38,6400
Bitkisel Yağ	4,0000
Sodyum fosfat	0,4000
Dikalsiyum fosfat	1,0000
Vitamin karması ^a	0,5000
Mineral karması ^b	0,1800
Toplam	100,0000

(a) Vitamin Karması (Rovimix 107): Her 5 kg Rovimix 107’de aktif madde olarak: D₃ vitamini 1,000,000 IU, E vitamini 100,000 IU, A vitamini 10,000,000 IU, K vitamini 15,000 mg, B₁ vitamini 5,000mg, B₂ vitamini 15,000 mg, Calcium D-Pantothenate 50,000 mg, Niacin 150,000 mg, B₆ vitamini 10,000 mg, B₁₂ vitamini 20 mg, Choline Chloride 500,000 mg, Folic Acid 3,000 mg, D-Biotin 1,000 mg ve C vitamini 300,000 mg içerir.

(b) Mineral Karması (mg/kg): Fe 35,000, Mn 80,000, Zn 50,000, Cu 5,000, I 2,000, Co 400 ve Se 150.

Araştırmada kullanılan yemin ham besin madde miktarları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Araştırmada kullanılan yemin ham besin madde düzeyleri (%)

Ham Besin Maddeleri	%
Protein	37,53
Yağ	7,48
Kül	14,90
Selüloz	4,05
Azotsuz Öz Madde	29,56
Nem	6,48
Toplam	100,00

Bu tez çalışmasında kullanılan yemin toplam enerji, protein/enerji düzeyleri, suda çözünme süresi, pH’sı, peletin çapı ve boyuna ait değerler ise Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3. Araştırmada kullanılan yemin toplam enerji, protein/enerji düzeyleri, suda çözünme süresi, pH'sı, peletin çapı ve boyuna ait değerler

Parametreler	Miktar
Toplam Enerji (kkal /g)	3,42
Protein/Enerji (mg/kkal)	115,30
Suda çözünme süresi (dk)	50-55
pH	5,96-6,10
Pelet çapı (mm)	2-2,5
Pelet boyu (mm)	19-22

2.1.5. Araştırmada kullanılan suyun özellikleri

Araştırmada kullanılan suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2,4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Araştırma suyunun özellikleri

Özellikler	Miktarlar
Sıcaklık (°C)	20-22
pH	8,02-8.30
Çözünmüş oksijen	7,05-7,20
Toplam sertlik	17 FS°
Toplam alkalinite	232,28 mgCaCO ₃ /L
Çözünmüş katı madde	219 mg/L
Kalsiyum	53,5 mg/L
Magnezyum	12,08 mg/L
Klorür	22,36 mg/L
Amonyak	0 mg/L
Bulanıklık (NTU)	0

2.1.6. Diğer araç ve gereçler

Araştırmada, kerevitlerin canlı ağırlık tartımı 0,05 g hassasiyetli dijital terazi, total boyları 1 mm taksimatlı ölçüm tahtası, suyun sıcaklığı, oksijen miktarı ve pH'ı 'Hanna-91140' model oksijen metre kullanılarak tespit edildi.

Laboratuvarlarda kesim için makas, pens, petri kutuları, otomatik pipet (50-1000µm), cam malzemeler (beher, mezür, tüp), analizlerin yapılması için spektrofotometre kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Araştırmanın planlanması ve kurulması

Keban Baraj Gölü Aydıncık yöresinden temin edilen kerevitler 200x200x50 cm boyutlarında 8 adet beton havuzlara stoklandı. Havuzların taban kısmına 7 cm çapında, 20-30 cm boyutlarında plastik borular yerleştirilerek kerevitlerin gizlenme alanları oluşturuldu. Kerevitlerin bulunduğu havuzlarda ortalama su sıcaklığı $21,8 \pm 1,12$, oksijen $7,04 \pm 0,51$ ve pH $8,03 \pm 0,22$ değerleri olarak kaydedildi. Kerevitlere verilecek yem miktarının tespit edilmesinde su sıcaklığı ön planda tutuldu (Çetinkaya, 1995). Belirlenen yem miktarı kerevitlere günde iki öğün halinde verildi. Kerevitler bu havuzlarda 20 gün bırakılarak ortam şartlarına adaptasyonları sağlandı.

Adaptasyon havuzundan alınan kerevitler 15 gün boyunca laboratuvar şartlarında bulunan 15 litre kapasiteli polipropilen dikdörtgen kaplara yerleştirilerek, toksikolojik uygulamanın yapılacağı ortam şartlarına adaptasyonları sağlandı. Bu kapların içerisinde havalandırma bağlanarak, 7 cm çapında, 15-20 cm çapında plastik borular yerleştirilerek kerevitlerin yaşam alanları oluşturuldu. Kerevitler bu ortamda da yemlenmeye devam edildi. Bu laboratuvarın ortam sıcaklığı devamlı olarak $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutuldu. Ayrıca, çalışma ortamında 14:10 saat aydınlık: karanlık ışık periyodu uygulandı.

Kontrol grubu kerevitler için ve farklı konsantrasyonlarda pestisit çözeltisi hazırlamak amacıyla Tip I ASTM standartlarına uygun olarak hazırlanmış su kullanıldı (ASTM, 1998). Bu amaçla, her bir kullanımdan önce taze olarak 1 L musluk suyu 625 mg NaCl olacak şekilde hazırlandı. Çalışma esnasında; su sıcaklığı, pH ve çözünmüş oksijen günlük olarak ölçüldü. Su kalitesi parametreleri: ortalama sıcaklık $9,4 \pm 0,5^\circ\text{C}$, pH $7,9 \pm 0,2$ ve çözünmüş oksijen $7,6 \pm 0,8$ mg / L olarak tespit edilmiştir.

2.2.2. Kerevit yeminin hazırlanması

Yemi oluşturan maddelerin uygun bir karışım haline getirilebilmesi için öğütüldü. Öğütülen yem maddeleri belirlenen oranlarda tartılarak homojen bir karışım sağlanacak şekilde harmanlandı. Sodyum fosfat, dikalsiyum fosfat, vitamin ve mineral karmalarını içeren karışım, sıcaklığı 20°C olan 1/1 oranında ilave edilen su ile birlikte karıştırıldı. Hamur haline getirilen yem kıyma makinesinde çekilerek pelet haline getirilip tepsilere

yerleştirildi. Yem fırınında, 60°C’de 24 saat bekletilerek kurutuldu. Yemlerin büyüklükleri ise Barım (2005)’ın tavsiye etmiş olduğu pelet yem büyüklükleri esas alınarak hazırlandı.

2.2.3. LC₅₀ değerlerinin belirlenmesi ve trifloksistrobin uygulama konsantrasyonları

Araştırmada, ortalama letal konsantrasyonun (LC₅₀) belirlenmesi amacıyla kullanılan kerevitlerin ağırlık ve uzunluk parametreleri arasında istatistiksel olarak farklılığın olmamasına dikkat edildi.

ASTM statik yenileme yöntemi kullanılarak 96 saat boyunca TFS’nin farklı konsantrasyonlarına (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3250, 3500 ve 4000 mg Al/L(ppm)) maruz bırakıldı. Çalışmanın bu kısmı, her bir çalışma için toksisite testleri 10 L test solüsyonu (pestisit çözeltisi) içeren 15 L kapasiteli polipropilen dikdörtgen tanklarda yapıldı. Kontrol grubu ve her konsantrasyon için hazırlanan bütün kaplara havalandırma bırakılarak, plastik barınaklar yerleştirildi. Her bir kaba 6’şar adet kerevit bırakıldı. Toksisite testleri, her doz için 2 tekrarlı yapıldı.

Akut toksisite testinde, TFS’ nin 96 saatlik LC₅₀ değerlerini tayin etmek için kerevitler 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kontrol edildi. Ölü ve canlı bireyler saptanıp sayıları kaydedildikten sonra, ölü olan kerevitler ortamdan uzaklaştırıldı. Pestisit çözeltileri yenilendi. Kerevitlerde hareketsizlik ölüm kriteri olarak kabul edildi. Dördüncü günün (96. saat) sonunda tüm ölü ve hayatta kalan kerevit sayısı belirlendikten sonra, deney sonlandırıldı. Aralık belirleme deneylerinden sonra bu pestisitler için uygulama konsantrasyonları LC₅₀ değerlerine bağlı olarak saptandı. Çalışılan TFS ile ilgili olarak gerek Türk Çevre Mevzuatında gerekse Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Avrupa Birliği (EU) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından kabul edilebilir değer olarak verilen herhangi bir konsantrasyon bulunmamasından dolayı LC₅₀ verileri doğrultusunda, çalışılan TFS’nin çevrede bulunabilecek düzeylerinin etkisini belirlemek amacıyla LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 olacak şekilde 4 subletal doz tespit edildi.

2.2.4. Kerevitlerin subakut toksisite deneyleri

TFS’nin *A. lepdodactylus* üzerindeki subletal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla uygulama grupları oluşturuldu. Araştırmanın subakut deney kısmında kullanılan

kerevitlerin ağırlık ve uzunluk parametreleri arasında istatistiksel olarak farklılığın olmamasına dikkat edildi. Her bir grubun hazırlanan bütün kaplara havalandırma bırakılarak, plastik barınaklar yerleştirildi. Hazırlanan 15 L kapasiteli polipropilen dikdörtgen tanklara her doz için kendine ait 10 L pestisit çözeltisi ve 8'şer adet kerevit bırakılarak deney düzeneği kuruldu. Subakut toksisite testleri, her doz için 2 tekrarlı yapıldı. TFS'nin bir seri subletal konsantrasyonuna (LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/8$) 96 saat süre ile statik yenilemeli test ortamında maruz bırakıldı. Kerevitler, uygulamanın başlatılmasını takiben 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kontrol edildi. Ölü kerevitler ortamdaki alındıktan vesayileri kaydedildikten sonra, TFS çözeltileri yenilendi. Uygulama sonunda ortamdaki ölü kerevitler uzaklaştırıldıktan sonra, kalan kerevitler buz anestezisi ile uyuşmaları sağlanarak hızlı bir şekilde disekte edilmiştir. Diseksiyon sonunda zaman kaybetmeden alınan hepatopankreas, solungaç ve kas dokuları kilitli poşetlere alınarak, biyokimyasal analizlerin yapılacağı zamana kadar -80°C 'de derin dondurucuda (Thermo, Forma -86°C Ultra-low Temperature Freezer) muhafaza edilmiştir.

2.2.5. Kerevit dokularının homojenizasyon ve santrifüj işlemleri

Dokuların homojenizasyonuna başlamadan önce, kilitli poşetler buz üzerinde çözülmeye bırakıldı. Su damlacıkları pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra tartıldı. Her bir dokunun homojenizasyon işlemi dokunun toplam ağırlığının 4 kat hacminde (w/v) daha önceden sağutulan homojenizasyon tamponu içinde yapıldı. Bütün dokular tek tek buz kabı içinde cam-teflon homojenizatör (Heidolph® RZ 2021) kullanılarak, 2000 rpm'de 30 sn parçalandı. Bu işlemden sonra homojenatlar ependorf tüplerine aktarıldı. Bütün homojenat 4°C 'de 16,000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüje (Hettich 460 R) tabi tutuldu.

2.2.6. Biyokimyasal parametrelerin belirlenmesi

Oksidatif stresin göstergesi malondialdehit (MDA) ve antioksidan belirteci olarak SOD, GPx ve GSH miktarları ile toplam protein miktarlarının ölçüm işlemleri, dokuların homojenizasyonu ve santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin mikropilok okuyucu sistem (Thermo, Varioscan Flash 2000) kullanılarak yapıldı. Her analiz ölçümlerinde, her bir örnek için 4 tekrarlı absorban okuması yapıldı. Dokulardaki toplam protein düzeyleri ölçüldükten sonra GPx ve SOD enzim aktivitelerine spesifik aktivite

(sırasıyla Unit/mg protein ve $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) cinsinden ifade edildi. MDA, GSH değerlerindeki değişim ise sırasıyla nmol/mg protein ve nmol GSH/mg protein olarak ifade edildi.

2.2.7. Oksidatif stresin (mda) tayini

Doku lipid peroksit seviyesini belirlemek için çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun önemli son ürünlerinden birisi olan malondialdehit düzeyinin ölçümünde, Buege ve Aust (1978) tarafından tanımlanan yöntemin modifiye edilerek mikropilaka okuyucu sisteme uyarlanmış spektrofotometrik metodu kullanılmıştır. Bu metod, MDA'nın aerobik şartlarda asidik ortamda tiobarbiturik asit (TBA) ile 100°C 'de yaklaşık 15 ile 60 dakika arasında inkübasyonu sonucu oluşturduğu pembe/kırmızı renkli kompleksin oluşumu temeline dayanmaktadır.

Ayırıcılar:

Reaksiyon Karışımı İçin

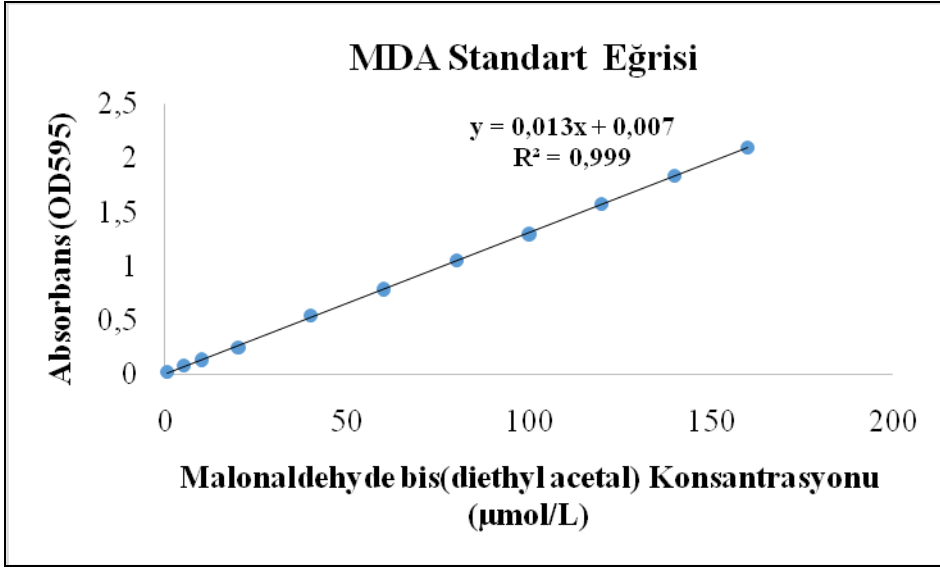
- a. %15 Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi
- b. %0.375 Tiobarbiturik asit (TBA) çözeltisi
- c. 0.25 N Hidroklorik asit (HCl) karışımı hazırlandı.

İşlem:

1. 500 μL homojenat üzerine 1500 μL reaksiyon karışımı ilave edildi.
2. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak 30 dk 100°C 'deki kaynar su banyosunda inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığında soğutuldu.
4. Soğutulan tüpler, 16000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası tüplerden alınan süpernatantdan 250 μL alınarak mikropilaka kuyucuklarına 3 tekrarlı olacak şekilde pipetlendi.
6. Son olarak, 535 nm'de köre (500 μL dH_2O + 1500 μL reaksiyon karışımı) karşı spektrofotometrik olarak okundu.

Sonuç:

Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri, 1, 1', 3, 3' Tetraetoksipropan ile hazırlanan standart grafiğinden yararlanılarak μM cinsinden numunedeki MDA düzeyleri bulundu ve doku MDA düzeyleri nmol/mg protein olarak ifade edildi (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Malondialdehit (MDA) standart eğrisi

2.2.8. Antioksidanların tayini

2.2.8.1. Süperoksit dismutaz (sod) aktivitesinin tayini

Dokulardaki SOD aktivitesinin tespitinde Sun ve ark., (1988) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek, mikrolaka okuyucu sisteme (Thermo Scientific Varioskan® Flash) uyarlandı.

Prensip: Bu yöntem reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyonla oluşturulan süperoksitradikallerinin, ortamda bulunan nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi temeline dayanır. Yöntemde O_2^- üretimi ksantin-ksantin oksidaz enzimatik tepkimesi ile sağlanır. Bu tepkime sonucunda oluşturulan süperoksit radikalleri NBT ile reaksiyona girerek maksimum absorbansını 560 nm de veren bir formazon oluşturur.

Ortama ilave edilen enzimin radikalleri dismutasyona uğratması sonucunda NBT redüksiyon reaksiyonu oldukça yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değeri düşer. Bunun sonucunda formazon oluşumunun inhibisyonun tayiniyle SOD miktarı indirekt olarak tespit edilmektedir.

Mikrolaka sisteme uyarlanmış modifiye SOD aktivitesi tayini için 96 kuyucuklu plakadaki (mikroplakalar) test ve köre ait kuyucuklara aşağıda gösterildiği gibi çözeltiler ilave edildi. Reaksiyon son hacmi 300 µL olup, kör ve örnekler için 3 tekrarlı sistem

oluşturuldu. Kuyucuklara 10µL dH₂O ve test kuyucuklarına 10µL örnek tek kanallı dijital pipet ile pipetlendi. Kör ve test kuyucuklarına 285 µL reaktif reaksiyon karışımı 8 kanallı dijital pipet yardımıyla pipetlendi ve üzerine 5µL ksantin oksidaz çözeltisi ilave edildi. Mikroplakalar karıştırılarak 20 dakika odası sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bütün kör ve test kuyucuklarına 10µL CuCl₂.2H₂O eklenerek reaksiyon durduruldu ve mikropilaka okuyucu sistemde (Thermo Scientific Varioskan® Flash) 560nm'de saf suya karşı okuma yapıldı.

	Kör	Numune
Reaktif (µL)	285	285
Örnek (µL)	----	10
dH ₂ O (µL)	10	----
Ksantin oksidaz (µL)	5	5
Karıştırılır ve 25°C odası sıcaklığında 20 dakika bekletilir.		
CuCl ₂ .2H ₂ O (µL)	10	10

Reaksiyon ortamında bulunan enzim aktivitesi Unite/mg protein olarak değerlendirildi.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{560nm}}{dk} \text{ Kör} - \frac{\Delta A_{560nm}}{dk} \text{ Numune} \right)}{\frac{\Delta A_{560nm}}{dk} \text{ Kör}} \times 100$$

$$\text{SOD Aktivitesi} \left(\frac{\text{Unite}}{\text{mL}} \right) = \frac{(\% \text{ İnhibisyon})}{\%50 \times 0.1 \text{ mL}} \times \text{D.F.}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} \left(\frac{\text{Unite}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{\text{SOD Aktivitesi} \left(\frac{\text{Unite}}{\text{mL}} \right)}{\text{Protein miktarı} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

D.F.: Dilüsyon Faktörü.

%50: NBT'nin indirgenmesini %50 inhibe eden enzim miktarı.

0.1mL: Herbir kuyucukta harcanan enzim hacmi (mL).

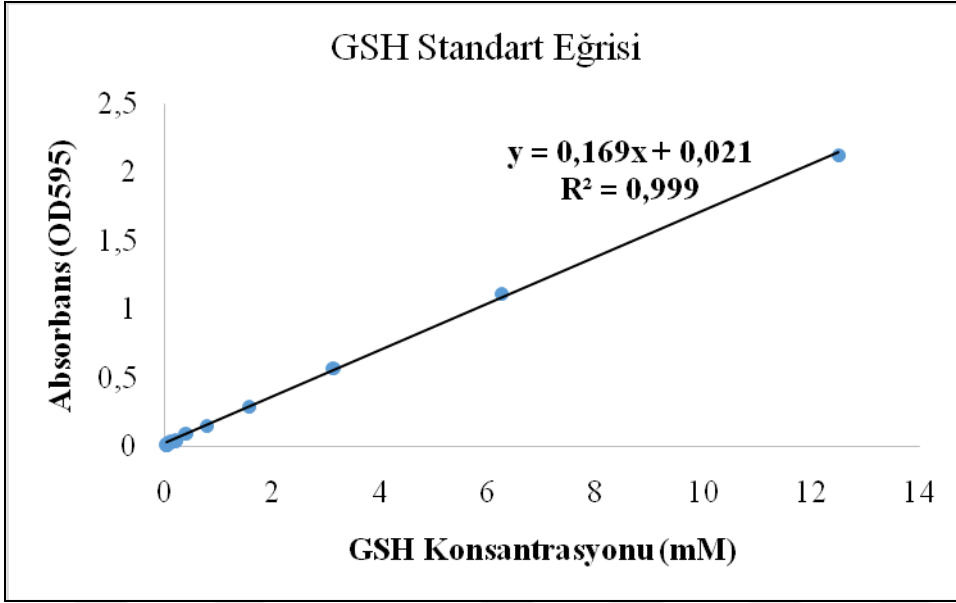
2.2.8.2. Glutasyon peroksidaz aktivitesi

Bu çalışmada S16 fraksiyonlarında GPx aktivitesi Bell ve ark., (1985) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmiş ve mikropilaka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli uygulandı. GPx aktivitesi ölçümünde H₂O₂ substrat olarak, sodyum azid

(NaN_3) ise katalaz inhibitörü olarak kullanıldı. Bu analiz için, mikrolaka kuyucuklarına 10 μL süpernatant ve 160 μL 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.32 ünite GSH-redüktaz, 1 mM EDTA, 2 mM NaN_3 içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu pipetlendikten sonra bu karışım 20°C’de 6 dakika süresince inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklara 30 μL 1.67 mM H_2O_2 pipetlenerek reaksiyon başlatıldı. NADPH oksidasyonuna bağlı olarak absorbans değişimi 25°C’de 3 dakika süreyle 340 nm’de kaydedildi ve spesifik enzim aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden belirlendi (340 nm’de NADPH için $\epsilon=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.2.8.3. Redükte glutatyon (gsh) tayini

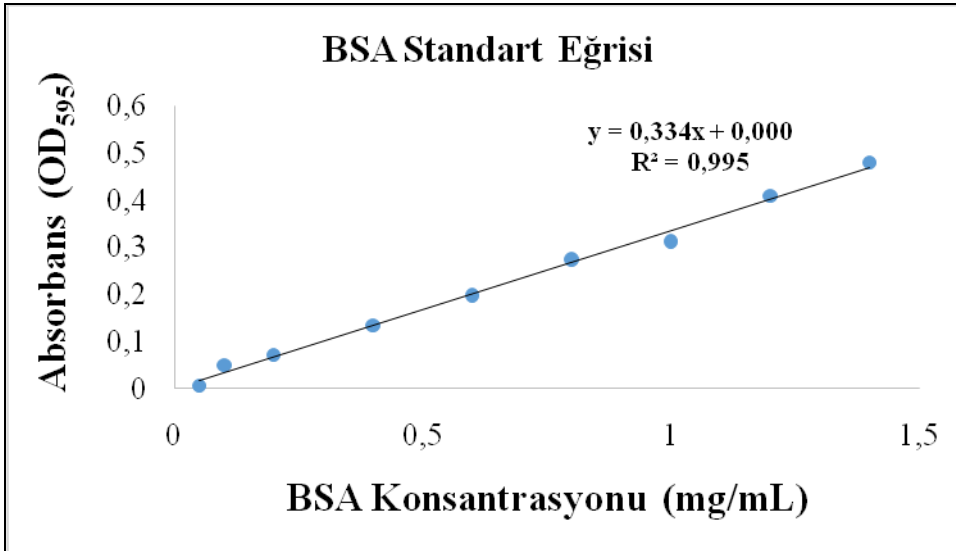
GSH değeri, Jollow ve ark., (1974) tarafından geliştirilen yöntem ile tespit edildi. Redükte glutatyon formunu, genellikle hücresel proteinlerin yapısında bulunmayan sülfidril gruplarının büyük kısmı oluşturmaktadır. Bu yöntemin esası, sülfidril bileşiklerinin Ellman reaktifi ile reaksiyona girmesi ve nispeten kararlı sarı rengin oluşması temeline dayanmaktadır. Ellman’ın reaktif maddesi olan DTNB’nin redükte glutatyon ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan kromoforik ürün, 2-nitro-5-hiobenzoik asit, 412 nm’de bir molar absorpsiyona sahiptir. 412 nm’deki absorbans, GSH içeriği ile orantılıdır (Ezemonye ve Enuneku, 2011). Her bir süpernatant toplam reaksiyon karışımında 5 μL olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi. Bunun üzerine son reaksiyon karışımında 0.5 mM DTNB (5', 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) olacak şekilde, 0.1 M pH: 6.8 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış karışımdan 120 μL ilave edildi. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildi. Daha sonra 10 saniye boyunca çalkalandı ve absorbans 25 °C’de GSH standart eğrisine karşı 412 nm’de okundu. Numunelerin GSH seviyesi nmol GSH /mg protein olarak kaydedildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Redükte glutatyon (GSH) standart eğrisi

2.2.8.4. Toplam protein miktarı tayini

Doku homojenatlarında toplam protein miktarları Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntemle göre ve mikropilaka okuyucu sisteme uyarlanarak saptandı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Bovine Serum Albumin (BSA) standart eğrisi

2.3. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla istatistik paket programları kullanıldı. Dokularda biyokimyasal analizler sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde LC_{50} (ortalama öldürücü konsantrasyon) değerlerinin saptanması amacıyla SPSS 24.0 programı (SPSS Inc., USA) kullanıldı. Hem ölüm oranlarının hem de enzim aktivitelerinin uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi için varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi uygulandı. Gruplar arası farklılık düzeyi en az %99 olasılık ile ($p < 0.01$ için) önemli olarak kabul edilerek gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p < 0.01$ düzeyinde önem seviyesine göre belirlendi. Gruplar arası farklılığın olduğu tespit edildiğinde, her bir biyokimyasal parametre için örnekler ikili karşılaştırma ile non-parametrik Mann-Whitney U testine göre kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

Akut ve subakut çalışmada kullanılan kerevit grupları arasında ağırlık ve uzunluk açısından istatistiksel bir farklılık olmamasına dikkat edildi. Trifloktrobinin akut testlerinin uygulandığı gruplarda ortalama $15,28 \pm 2,09$ g ağırlığında olan bireyler kullanıldı ($p > 0,05$). Araştırmanın subakut kısmında ise TFS'nin LC_{50} ($16,34 \pm 2,06$ g), $LC_{50}/2$ ($15,98 \pm 1,97$ g), $LC_{50}/4$ ($16,49 \pm 1,83$ g) ve $LC_{50}/8$ ($15,64 \pm 1,51$ g) dozlarının uygulandığı kerevit gruplarının ağırlıkları arasında yapılan Duncan testi sonucunda istatistiksel açıdan farklılığın olmadığı belirlendi ($p > 0,05$).

Tez çalışmasında TFS türü pestisit toksitesini ve etkilerini belirlemek üzere tüm aşamalarda iki farklı uygulama grubu kuruldu. Öncelikle *A. leptodactylus* pestisitini belirlenen bütün konsantrasyonlarına 96 saat statik yenilemeli olarak hazırlanan test düzeneğine maruz bırakıldı. Buna bağlı olarak TFS'nin ortalama öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) değeri belirlendi.

Çalışmamızda TFS'nin ticari formülasyonu kullanıldığından dolayı, deneyde kullanılan LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/4$, ve $LC_{50}/8$ konsantrasyonları, pestisite ait ticari paketin üzerindeki % ya da litredeki aktif etken madde (**AI; active ingredient**) miktarına göre hesaplandı.

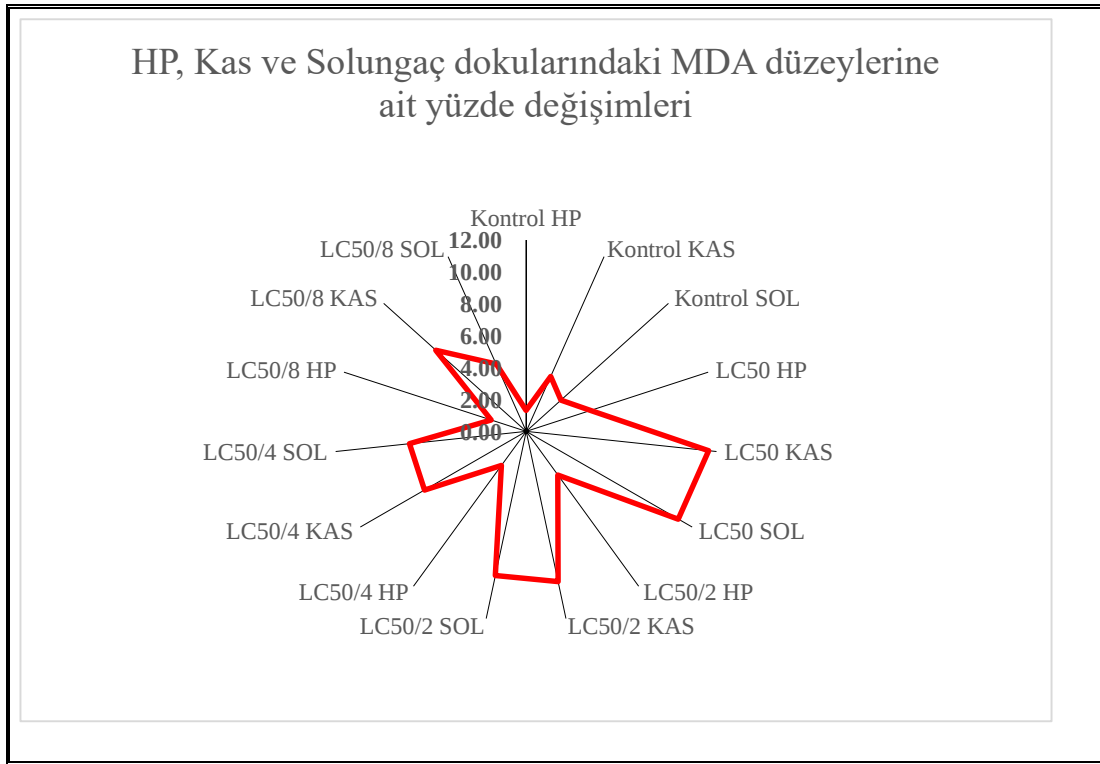
Pestisit	LC_{50} (mg AI/L)
TFS'nin 96 saatlik LC_{50} değerleri	1824,00

Akut ve subakut çalışmaların yapıldığı polipropilen kaplarda günlük olarak yapılan analizlerle suyun ortalama sıcaklığı, oksijen (mg/L) ve pH değerleri tespit edildi.

Subakut araştırmalar sonucunda araştırma gruplarındaki (LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/8$) kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaçlarındaki oksidatif stres (MDA), antioksidan (SOD, GSH-Px, GSH) düzeyleri şekil 3.1'de verildi.

Araştırma sonuçlarına göre; hepatopankreasdaki MDA aktivitesinin kontrol grubuna göre LC_{50} 'de %221,21 $LC_{50}/2$ 'de %155,30, $LC_{50}/4$ 'de %99,24, $LC_{50}/8$ 'de %74,24 oranında arttığı belirlendi. Bu aktivitenin kas dokusunda kontrol grubuna göre, LC_{50} 'de %204,49 $LC_{50}/2$ 'de %154,76, $LC_{50}/4$ 'de %94,44, $LC_{50}/8$ 'de %101,32 oranında arttığı tespit edildi. MDA aktivitesi solungaç dokusunda ise kontrol grubuna göre, LC_{50} 'de

%274,48 LC₅₀/2’de %213,94, LC₅₀/4’de %150,00, LC₅₀/8’de %56,80 oranında arttığı saptandı. Aynı enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması LC₅₀’ye göre de yapıldı. Buna göre hepatopankreasdaki MDA aktivitesi LC₅₀’ye göre LC₅₀/2’de %20,51, LC₅₀/4’de %37,97, LC₅₀/8’de %45,75 oranında azaldığı belirlendi. Bu enzim aktivitesi LC₅₀’ye göre kas dokusunda LC₅₀/2’de %16,33, LC₅₀/4’de %36,14, LC₅₀/8’de %33,88 oranında, solungaç dokusunda ise LC₅₀/2’de %16,17, LC₅₀/4’de %33,24, LC₅₀/8’de %58,12 oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 3.1).

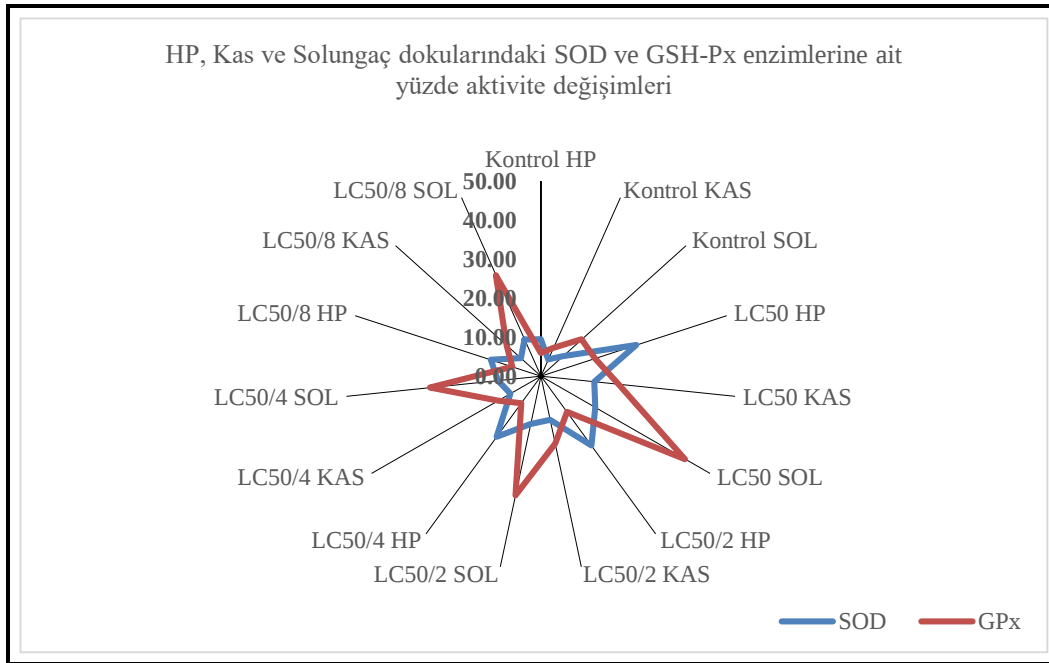


Şekil 3.1. 96 saat boyunca Trifloxystrobin’in LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 dozlarına maruz bırakılmış kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki MDA düzeylerine ait yüzde değişimleri

Yapılan analiz sonuçlarına göre; hepatopankreasdaki SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre, LC₅₀’de %172,54 LC₅₀/2’de %133,29, LC₅₀/4’de %103,92, LC₅₀/8’de %42,62 oranında arttığı belirlendi. Bu aktivitenin kas dokusunda kontrol grubuna göre, LC₅₀’de %194,63 LC₅₀/2’de %145,70, LC₅₀/4’de %93,99, LC₅₀/8’de %48,06 oranında arttığı tespit edildi. SOD aktivitesi solungaç dokusunda ise kontrol grubuna göre, LC₅₀’de %112,23 LC₅₀/2’de %65,52, LC₅₀/4’de %45,26, LC₅₀/8’de %34,34 oranında arttığı saptandı. Aynı enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması LC₅₀’ye göre de

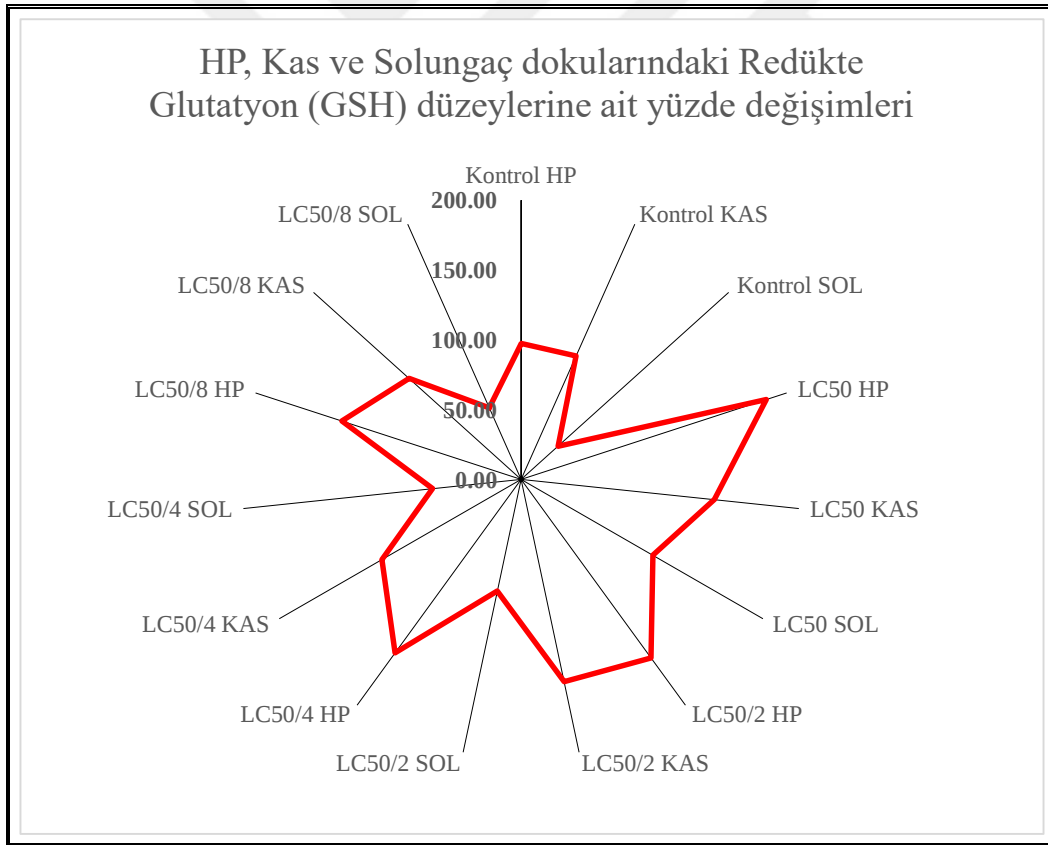
karşılaştırıldı. Buna göre hepatopankreasdaki SOD aktivitesi LC₅₀'ye göre LC₅₀/2'de %14,43, LC₅₀/4'de %25,20, LC₅₀/8'de %47,68 oranında azaldığı belirlendi. Bu enzim aktivitesi LC₅₀'ye göre kas dokusunda LC₅₀/2'de %16,60, LC₅₀/4'de %34,15, LC₅₀/8'de %49,74 oranında, solungaç dokusunda ise LC₅₀/2'de %22,00, LC₅₀/4'de %31,55, LC₅₀/8'de %36,70 oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 3.2).

Bu araştırma sonucunda yapılan analizlere göre; hepatopankreasdaki GSH-Px aktivitesinin kontrol grubuna göre, LC₅₀'de %138,25, LC₅₀/2'de %92,71, LC₅₀/4'de %45,59, LC₅₀/8'de %29,66 oranında arttığı belirlendi. Bu aktivitenin kas dokusunda kontrol grubuna göre, LC₅₀'de %153,28, LC₅₀/2'de %123,35, LC₅₀/4'de %58,83, LC₅₀/8'de %49,87 oranında arttığı tespit edildi. GSH-Px aktivitesi solungaç dokusunda ise kontrol grubuna göre, LC₅₀'de %203,20, LC₅₀/2'de %122,36, LC₅₀/4'de %103,06 LC₅₀/8'de %100,99 oranında arttığı saptandı. Aynı enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması LC₅₀'ye göre de yapıldı. Buna göre hepatopankreasdaki GSH-Px aktivitesi LC₅₀'ye göre LC₅₀/2'de %21,96, LC₅₀/4'de %41,04, LC₅₀/8'de %47,49 oranında azaldığı belirlendi. Bu enzim aktivitesi LC₅₀'ye göre kas dokusunda LC₅₀/2'de %11,81, LC₅₀/4'de %37,28, LC₅₀/8'de %40,00 oranında, solungaç dokusunda ise LC₅₀/2'de %26,59, LC₅₀/4'de %33,02, LC₅₀/8'de %33,71 oranında azaldığı görüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 96 saat boyunca Trifloxystrobin'in LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 dozlarına maruz bırakılmış kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki SOD ve GSH-Px enzimlerine ait yüzde aktivite değişimleri

Araştırma sonuçlarına göre; hepatopankreasdaki GSH aktivitesinin kontrol grubuna göre LC₅₀'de %89,84, LC₅₀/2'de %62,82, LC₅₀/4'de %58,09, LC₅₀/8'de %38,87 oranında arttığı belirlendi. Bu aktivitenin kas dokusunda kontrol grubuna göre, LC₅₀'de %44,14, LC₅₀/2'de %53,56, LC₅₀/4'de %19,26, LC₅₀/8'de %11,94 oranında arttığı tespit edildi. GSH aktivitesi solungaç dokusunda ise kontrol grubuna göre, LC₅₀'de %207,13, LC₅₀/2'de %131,09, LC₅₀/4'de %80,27, LC₅₀/8'de %58,15 oranında arttığı saptandı. Aynı enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması LC₅₀'ye göre de yapıldı. Buna göre hepatopankreasdaki GSH aktivitesi LC₅₀'ye göre LC₅₀/2'de %14,22, LC₅₀/4'de %16,72, LC₅₀/8'de %26,84 oranında azaldığı belirlendi. Bu enzim aktivitesi LC₅₀'ye göre kas dokusunda LC₅₀/2'de %6,53 oranında artarken, LC₅₀/4'de %17,25, LC₅₀/8'de %22,33 oranında, solungaç dokusunda ise LC₅₀/2'de %24,75, LC₅₀/4'de %41,30, LC₅₀/8'de %48,51 oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 96 saat boyunca Trifloxystrobin'in LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 dozlarına maruz bırakılmış Kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaç dokularındaki Redükte Glutasyon (GSH) düzeylerine ait yüzde değişimleri

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Astacus leptodactylus'türü kerevitlerde TFS'nin akut değerinin belirlenip, subakut dozlarının (LC50, LC50/2, LC50/4 ve LC50/8) kerevit dokularında oksidatif stres ve enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada; düzenlenen ortamlardaki su kalite kriterlerinin canlının yaşaması için optimal değerlere sahip olduğu belirlendi. Köksal (1988), Skurdal ve Taugbol (2002), Barım (2005), *A. leptodactylus*'un yaşadığı ortamlarda su sıcaklığının kabuk değiştirmek için 7-12 °C, üremeleri için 4-13 °C, büyümeleri için 14-22 °C, oksijenin en az 2 mg L⁻¹, pH'ın 6,5-8,5, kalsiyumun 5 mg L⁻¹'den az olmaması gerektiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada oluşturulan ortamlardaki ortalama su sıcaklığı değerlerinin bildirilen su kalite kriterleri ile uyum sağladığı tespit edilmiştir.

Krustase yemlerinde bulunması gereken ham protein ve yağ ihtiyacı birçok araştırmacı tarafından farklı kerevit türlerinde araştırılmıştır. Bu araştırmacılar arasında; yemlerdeki ham protein değerini D'Abramo ve ark. (1985), Goddard (1988) *Procambarus acutus*'larda %50,5; *Pacifastacus leniusculus*'larda %39; *Astacus astacus*'larda %40; Köksal (1988) *A. leptodactylus*'larda %30,93; Ravi ve ark. (1999) *Cherax tenuimanus*'larda %21,87 olarak saptarken, ham yağ düzeyini, Köksal (1988) *A. leptodactylus*'larda % 7,82; Ackefors ve ark. (1992), *A. astacus*'larda %7; Lee ve Lawrence (1997), Ravi ve ark. (1999) *C. tenuimanus*'larda %6,02 olarak tespit etmişlerdir. Barım (2005) tarafından oluşturulan yem bileşiminin kullanıldığı bu çalışmada yapılan analizler sonucunda ham protein değerinin yaklaşık olarak %37, ham yağ değerinin ise yaklaşık olarak %7 olduğu belirlendi. Farklı krustase türleri için oluşturulan yemin ham protein ve yağ düzeylerinin türe ve büyüklüğe göre değişmesiyle beraber, bu tür kerevitlerde kullanılan yem bileşimleri ile bizim çalışmamızda kullanılan yem bileşiminin uyumlu olduğu saptandı.

Canlılar için yüksek risk taşıyan çevresel kirlilik, tüm dünyada bir çok türe ait popülasyon azalmasına hatta yok olmasına sebep olmuştur. Bu canlıların yaşadığı çevrede oluşan kirliliğin, canlı üzerindeki etkileri; ya canlının bulunduğu doğal ortamlardan örnekler alınarak ya da laboratuvar ortamlarında benzer şartlar oluşturularak incelenmektedir. Böylece dünya üzerinde kullanılan kimyasal maddelerin etkili dozları ve vücuttaki etki mekanizmaları tespit edilmektedir. Bazı canlı türleri hem sulardaki kirlilik oranlarının hemde bu kirleticilerin etki mekanizmalarının tespit edilmesinde adeta anahtar bir organizma gibi kullanılmaktadır. *A. leptodactylus* türü kerevitler çok yönlü beslenme

özelliğine sahip olmaları ve hareket kabiliyetlerinin düşük olmasından dolayı sucul ekosistemlerdeki çevresel sorunların belirlenmesi için iyi bir biyoindikatör tür olarak kabul edilmektedir (Barım ve ark., 2009; Barım ve Karatepe, 2010; Uçkun, 2013). Ancak balıklar üzerine kirletici maddelerin etkileri ile ilgili yoğun çalışma yapılmasına rağmen kerevit toksikolojisi ile ilgili yapılan araştırmalar oldukça sınırlıdır.

Barım ve Karatepe (2010) tarafından Keban Baraj Gölü'nde temiz (Aydıncık) ve kirli (Ağın) istasyonlarda yapılan çalışmada, *A. leptodactylus* türü kerevitin hepatopankreas ve kas dokusundaki MDA düzeyinin kirlilikle arttığı, Vitamin E, C ve A miktarlarının ise kirlilikle azaldığı belirlenmiştir. Aynı bölge ve istasyonlarda yapılan farklı çalışmalarda ise kas, hepatopankreas ve solungaç dokularında kirlilikle bağlantılı olarak MDA değerinin yükseldiği, SOD, GSH-Px, GSH enzim düzeylerinin ve arginaz seviyesinin değiştiği tespit edilmiştir (Barım ve ark., 2009). Yapılan bu çalışmalar, *A. leptodactylus* türü kerevitin su kirliliğinin canlı üzerindeki etkilerinin araştırılmasında biyoindikatör olarak kullanılabileceğini teyit etmiştir.

Bu tez çalışmasında seçilen TFS adlı pestisit tarımsal arazilerdeki uygulama konsantrasyonları yüksek olmasına rağmen, bu kimyasalların sudaki dağılım oranları oldukça hızlıdır ve çevredeki yarılanma ömürleri kısadır. Bununla birlikte, *A. leptodactylus* türü kerevit ve seçilen biyokimyasal parametreler üzerine pestisit kısa süreli etkilerinin değerlendirilmesi, çevresel koşullar altında bu kimyasala ait toksik etki mekanizmalarının anlaşılması için bir bilgi teşkil edecektir. Su ortamında canlılar üzerine pestisitlerin etkilerini ortaya koymayı amaçlayan toksikolojik çalışmalar farklı basamaklarda gerçekleştirilebilmektedir. Temel olarak canlılık hücre ile başlayıp kumünitelere kadar geliştiğine her basamaktaki etki farklı şekilde ortaya çıkar. Ortamda bulunan herhangi bir toksik kimyasal madde canlı vücuduna girdikten sonra hücre içinde bazı yapısal değişikliklere neden olur. Kirletici maddelerin fizikokimyasal özellikleri ve çevresel süreçler arasındaki etkileşimler onların dağılımı, akibeti ve canlılar üzerindeki etkilerini belirler. Ortalama maddelerin girişi ve olası birikimi belirli taşınım ve dönüşüm süreçleri ile kontrol edilir. Bu süreçlerin net etkisi ölçülecek biyolojik etkiye karşılık gelen doz ve muamele seviyesini tayin eder (Parlar ve ark., 2009; Uçkun, 2013). Yapılan bu araştırmanın sonucunda, test materyali olarak kullanılan TFS'nin *A. leptodactylus* üzerinde toksik etkilere neden olduğu belirlendi. TFS ile yapılan çalışmalarda özellikle en yüksek konsantrasyonda bütün kerevitlerin kısa sürede öldüğü tespit edildi.

Yapılan toksisite çalışmaları sonucunda TFS'nin 96 saatlik LC₅₀ değeri 1824,00 mg AI L⁻¹ olarak belirlendi. TFS, toprak ve sucul ortamda çok hızlı bir şekilde yıkıma uğramasına rağmen, serbest asit metabolitleri ana bileşiğe göre daha yavaş yıkımgöstermektedir. Buna ilave olarak araştırmalar sonucunda, TFS'nin suda yaşayan omurgasızlar ve balıklar için çok zehirli olarak sınıflandırılmasına rağmen, suda nispeten düşük maruziyet konsantrasyonlarında bulunmasından dolayı, bu canlılar için düşük risk gösterdiği belirtilmiştir. TFS lipofilik özelliğe sahiptir. Bu fungusit türü madde; mitokondri iç membranında bulunan ve elektron taşıma sisteminin bir elemanı olan sitokrom *bc₁* enzim kompleksinin (integral membran protein kompleksi) kinol (ubikinol) oksidasyon (Q₀) bölgesine bağlanarak sitokrom *b* ve sitokrom *c₁* arasındaki elektron transferini bloke eder. Redükte NADPH oksidasyonunu ve ATP sentezini engelleyerek hücre solunumu sekteye uğratır. Böylece enerji üretimini durdurarak canlının ölümüne neden olur (Bartlett ve ark., 2002; Balba 2007; Fernández-Ortuño ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, TFS'nin balıklar için 96 saatlik LC₅₀ değerleri, 0,015 mg/L – 0,52 mg/L arasında değişirken, sucul omurgasızlarda 48 saatlik EC₅₀ değerleri, 0,011 mg/L – 0,20 mg/L arasında değişmiştir (European Commission, 2003; EPA, 2002). Belden ve ark., (2013), yaptıkları bir çalışmada *Bufo cognatus* iribaşları için TFS ve ticari formu olan Stratego formülasyonunun 72 saatlik LC₅₀ değerlerinin sırasıyla 104 µg L⁻¹ ve 100 µg AI L⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir (Hooser ve ark., 2012). Yapılan çalışmada Zhu ve ark., (2013) 10 µg L⁻¹ TFS dozuna maruz bırakılan *Oryzias latipes* türlerinin mortalite oranlarını arttığını belirlemişlerdir. Junges ve ark., (2012) tarafından yapılan araştırmada TFS nin farklı dozlarının uygulandığı türlerde 24 saatlik LC₅₀ değeri *Rhinella arenarum* için 0,22 mg L⁻¹ , *Rhysalaemus santafenicus* için 0,14 mg L⁻¹ , *Elachistocleis bicolor* için 0,10 mg L⁻¹ , *Leptodactylus latrans* için ise 0,26 mg L⁻¹ olarak kaydedilmiştir. Liu ve ark., (2013)'nın yaptıkları çalışmada, *Ctenopharyngodon idella* türü sazanları TFS'nin farklı dozlarına maruz bırakmaları sonucunda 48 saatlik LC₅₀ değeri 0,051 mg L⁻¹ olarak saptamışlardır. Lie ve ark., (2018) üç farklı strobilurin grubu pestisidin zebra emryoları üzerine letal etkilerini inceledikleri araştırmalarında TFS'nin 96 saatlik LC₅₀ değerinin 55 µg L⁻¹ olduğunu belirlemişlerdir. Shane ve ark., (2013). *Hyalella azteca* üzerine TFS'nin akut toksisitesini incelediklerinde LC₅₀ değerini 29,9 µg L⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. Jiang ve ark., (2019) *Danio rerio*'larda TFS'nin 96 saatlik LC₅₀ değerinin 0,029 mg L⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 1824 mg AI L⁻¹ olarak belirlenen 96 saatlik LC₅₀ değeri *A. leptodactylus* türü kerevitlerin TFS'ye yüksek oranda dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Bu araştırmada, TFS'nin bir seri subletal konsantrasyonuna (LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8) 96 saat süreyle maruz bırakılan *A. leptodactylus*'ların özellikle hepatopankreas, solungaç ve kas dokularındaki oksidatif stres (MDA) ve enzim düzeyleri (SOD, GSH-Px, GSH) analiz edildi. Kerevitlerde karaciğer ve pankreasın birleşmesiyle oluşan hepatopankreas, sindirim enzimlerinin üretildiği, çeşitli sentezlerin yapıldığı ve fazla miktarda alınan besinlerin, bazı ağır metal ve kalsiyumun depolandığı yerdir (Vogt, 2002; Barım, 2005). Bu organ krustaselerin bulundukları ortamlarda genel fizyolojik şartların belirlenmesinde anahtar bir role sahiptir. Ana sindirim bezidir, lipit bakımından zengindir ve metabolizmayı düzenlemekten sorumludur (Muriana ve ark., 1993). Solungaçlar solunumun ve biyotransformasyon ana organıdır (Borković ve ark., 2008). Kas ise kerevitlerin abdomen ve kısıkaçlarında bulunan yenilebilir kısımlarını oluşturduklarından ticari olarak önemlidir (Köksal, 1988; Barım, 2005). Bu üç doku içerisinde hepatopankreas ve solungaç dokuları, su kirliliğinin çevresel bir göstergesi olarak diğer organlardan daha fazla önerilmektedir (Karadede ve ark., 2008; Barım ve ark., 2009; Barım ve Karatepe, 2010). Bizim çalışmamızda da genel olarak, MDA seviyesinin TFS'nin LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 dozlarının uygulandığı gruplardaki kerevitlerin hepatopankreas, solungaç ve kas dokularında yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca bu araştırmada kasdaki MDA seviyesinin hepatopankreas ve solungaçdan daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu değerlerin yüksek olması, kas örneklerinin alındığı abdomen dokusunun ince bir zarla örtölü olmasından ve suyun abdomen kısmına etki oranının yüksek olmasından kaynaklanabilir. Kerevitlerde hepatopankreasın ve solungaçların MDA değerlerinin yüksek olması ise, bu organlarda bir çok oksidatif reaksiyonun meydana gelmesi sonucunda serbest radikal üretiminin yoğun olmasıyla ilişkilendirilebilir (Borković ve ark., 2008).

Zhua ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada *Gokiocypris rarus* türü cyprinid embryo ve larvalarının maruz bıraktıkları TFS'nin artan miktarları (0,5 ve 1,0 µg L⁻¹) ile oksidatif stresin yükselmesi sonucu MDA değerlerinin, yükseldiğini tespit etmişlerdir. Lie ve ark., (2018) üç farklı strobilurin grubu pestisidin zebra emryolarının oksidatif stres, antioksidan enzimler ve mRNA yapısı, Jiang ve ark., (2019) *Danio rerio*'larda TFS'nin artan miktarının dokulardaki enzim aktivitesi üzerine etkilerini inceledikleri araştırmalarında pestisit oranıyla reaktif oksijen türlerinin ve MDA'nın yükseldiğini belirlemişlerdir.

Filho ve ark., (2001) toksik maddelerin bulunduğu bir gölden yakaladıkları *Acará çiklit*'lerin (*Geophagus brasiliensis*) karaciğerlerinde önemli ölçüde daha yüksek oksijen tüketimi ve tiyobarbitürik asid reaktif madde düzeyleri belirlemişlerdir. Farombi ve ark.,

(2007) Ogun Nehri'nden elde edilen balıkların karaciğer dokularında (*Clarias gariepinus*) MDA seviyelerinin Agodi balık çiftliğinden elde edilen kontrol balıklarına kıyasla anlamlı düzeyde arttığını (%177) saptamışlardır. Valavanidis ve ark., (2006) oksijen ve nitrojen serbest radikallerinin biyolojik sistemlerde hücre fonksiyonunun fizyolojik kontrolünde gerekli olduğunu ve canlı hücreler tarafından sürekli olarak üretildiğini bildirmişlerdir. Kimyasal toksik kirleticiler, biyolojik sistemdeki reaktif oksijen türlerinin önemli kaynaklarıdır. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda kontaminant maruziyetinin oksidatif hasara yol açabileceği belirlenmiştir (Fatima ve ark., 2000). Araştırmacıların açıklamaları bulgularımızla paralellik göstermektedir.

SOD, oksijen radikallerine ve oksidatif strese yanıt veren ilk enzimdir (Winston ve Di Giulio, 1991). Bu çalışmada, hepatopankreas, solungaç ve kasdaki SOD aktivitesi kontrol grubundaki kerevitlere oranla LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 grubundaki kerevitlerde daha yüksek olduğu belirlendi. Bu çalışmanın sonuçları, SOD'un önemli ölçüde daha yüksek aktivitesini bulan Ahmed ve ark., (2006)'nın bulgularıyla paralellik göstermektedir. Araştırmacılar bu değerin yüksekliğinin artan serbest radikal üretiminin bir sonucu olarak aşırı SOD tüketimine bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 grubundaki kerevitlerde MDA değeri yükselirken SOD değerinin de yükseldiği tespit edilmiştir. Çalışmamıza benzer bir şekilde Zhua ve ark., (2015)'nin yaptıkları araştırmada da *Gokiocypris rarus* türü cyprinid embryo ve larvalarının maruz bıraktıkları TFS'nin artan miktarları (0,5 ve 1,0 µg L⁻¹) ile SOD değerlerindeki yükseldiğini saptamışlardır. Ancak Liu ve ark., (2013)'nin yaptıkları çalışmada *Ctenopharyngodon idella* türü sazanları TFS'nin farklı dozlarına maruz bırakmaları sonucunda SOD aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu araştırma sonucunda SOD aktivitesinin kasa oranla hepatopankreas ve solungaçlarda daha yüksek olduğu belirlendi. Bu bulgu hepatopankreasın lipid bakımından zengin ve ana sindirim bezi olmasından dolayı metabolik reaksiyonun bu dokuda yoğun olmasıyla, serbest radikal üretiminin yoğun olmasına bağlanabilir (Borković ve ark., 2008; Karadede ve ark., 2008; Barim ve ark., 2009; Barim ve Karatepe, 2010). Bu enzim değerinin solungaçta daha yüksek olmasının sebebi ise solunum sırasında solungaçlardaki O₂⁻'yi yok etme ihtiyacının arttığını gösterir (Arun ve Subramanian, 1998).

Vücutta oluşan metabolik aktiviteler esnasında “homeostasis” olarak ifade edilen vücut dengesinin korunmasında GSH-Px, LPO'ya karşı önemli bir rol oynar. Çünkü temel olarak organik peroksitlerin ve daha az ölçüde hidrojen peroksitlerin giderilmesinde GSH-

Px ilk tepki veren enzimlerden biridir. Bu nedenle, GSH-Px membranların LPO'ya bağlı hasarlardan korunmasında özellikle önemli bir enzim olduğu düşünülmektedir (Oost ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2004). Ahmed (2005), GSH-Px'in çeşitli çevresel pro-oksidan koşullarla, örneğin çeşitli kirlilik türlerine maruz bırakılarak indüklenebileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada, kontrol grubu kerevit dokularındaki GSH-Px enzim aktivitesi ile LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 gruplarındaki kerevit dokularının GSH-Px enzim aktivitesi arasında anlamlı bir fark belirlenmiştir. Vasseur ve Leguille (2004) ve Valavanidis ve ark., (2006) yaptıkları çalışmalarda dokular arasındaki GSH-Px değerlerindeki farklılığın canlıların kirleticilere maruz kaldıktan sonra çevresel değişime gösterdikleri bir tepki olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında GSH-Px aktivitesinin solungaç dokularında diğer dokularla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur. Borković ve ark., (2008) yaptıkları çalışma sonucunda; solungaçların, su kaynaklı koninantlarla ilk temas eden dokular oldukları için oksidatif strese düşük eşikli bir tepki gösterdiklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 gruplarındaki dokularda yüksek GSH-Px aktivitesi Valavanidis ve ark., (2006) tarafından yüksek düzeyde kirliliğe karşı artan ROS'a yanıt olarak, antioksidan savunmanın artabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda bu enzim değeri solungaçta yüksek iken hepatopankreas ve kasda düşük çıkmıştır. Toksikoloji ve çevre ile ilgili yapılan çalışmaların bazılarında benzer sonuçlar elde edilmişken bazı çalışmalarda farklı sonuçlar saptanmıştır. Örneğin, GSH-Px aktivitesinin, kirleticilere maruz kalan bazı su canlılarının karaciğerinde yüksek olduğu görülmesine rağmen, bu aktivite solungaçlarda düşüktü (Doyotte ve ark., 1997; Winston ve Di Guilio, 1991; Ahmad ve ark., 2000; Ahmed, 2005). Bununla birlikte, Ballesteros ve ark., (2008) toksik etkiye maruz kalan *Jenynsia multidentata* türü balıkların solungaçlarında ve karaciğerinde GSH-Px seviyelerinin düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Pandey ve ark., (2003) GSH-Px düzeylerinin kirliliğe maruz kalan alanlardaki *Wallago attu* türü balıkların karaciğerinde daha düşük, solungaçlarda daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda TFS'nin LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8 konsantrasyonlarının uygulandığı gruplardaki kerevitlerin, kontrol grubundaki kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaçlarındaki GSH-Px değerlerinden daha yüksek olması O₂⁻'den üretilen H₂O₂'nin artan miktarına ve enzim indükleyici etkisine bağlı olabilir.

Bu çalışmada, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre GSH-Px aktivitesinde indüksiyon görülmüştür (p<0.01). Antioksidan savunma sisteminin içerisinde

olan GSH-Px aktivitesindeki bu artış, literatürdeki farklı tür ve ksenobiyotiklerle yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermiştir. Thomas ve Wofford (1993) tarafından yapılan çalışmada *Micropogonias undulatus*'un 17 gün boyunca Aroklor 1254 (poliklorlu bifenil karışımı)'e maruz bırakılması sonucunda karaciğer ve ovaryum dokularında GSH-Px aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Vieira ve ark., (2008) poliaromatik hidrokarbon türleri olan Benzo[a]piren ve Antrasen'nin farklı konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bıraktıkları *Pomatoschistus microps* türü kayabalığında çeşitli biyokimyasal parametrelerin aktivitelerindeki değişimleri inceledikleri çalışmada SOD ve GSH-Px seviyelerinde artışa neden olduğu ($p<0.05$) rapor edilmiştir ($p<0.05$). Genel olarak bütün antioksidan enzimler, oksitleyici ortama karşı bir savunma mekanizması olarak görev alırlar ve yeni koşullara canlının adapte olmasında yardımcı olurlar.

GSH-Px ve glutatyonun lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdikleri bilinmektedir. Ayrıca GSH-Px, katalazın H_2O_2 'ye affinitesinin düşük olması nedeniyle hidrojen peroksitin hücrelerde uzaklaştırılmasında esas antioksidan enzim olarak görev almaktadır (Vieira ve ark., 2008).

Yapılan çalışmada kullanılan biyokimyasal parametrelerden GSH, hücredeki en yoğun protein olmayan tiyol kaynağıdır. Dokuları oksidatif hasardan korumak, intraselüler ortamı azaltılmış durumda tutmak için birçok fonksiyona sahiptir. GSH, GSH-Px tarafından katalize edilen bir reaksiyonla hidrojen ve organik-peroksitleri azaltır; 'OH ve tekli oksijen ($1O_2$) tutucu olarak işlev görür. Yapılan araştırmalarda su canlılarında GSH'nin oksidatif stres kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir (Ahmad ve ark., 2000). Bu çalışmada, kerevitlerin hepatopankreas ve kas dokularındaki GSH düzeyleri yüksek iken solungaçta düşüktü. Çalışmada TFS'nin LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/8$ konsantrasyonlarının uygulandığı gruplardaki kerevitlerin, kontrol grubundaki kerevitlerin hepatopankreas, kas ve solungaçlarındaki GSH değerlerinin daha yüksek olduğu saptandı. Benzer şekilde Farombi ve ark., (2007) kirli bölgeden toplanan yayın balığı (*Clarias gariepinus*)'nin karaciğerlerindeki GSH seviyesinin temiz bölgedekilere oranla önemli ölçüde yüksek olduğunu belirtti. Farklı bir çalışmada, Pandey ve ark., (2003) kirliliğin olduğu bölgeden toplanan *Wallago attu*' ların solungaçlarında GSH konsantrasyonunun temiz bölgeden toplananlara göre daha yüksek olduğunu ifade etti. Bu çalışmada, TFS'nin toksik değerinin artmasına bağlı olarak GSH'ın daha yüksek aktivitesi, serbest radikal üretimine bağlı olarak yükselen oksidasyona engel olmak için enzim değerlerinin artmasına bağlı olabilir. GSH seviyeleri kasa göre hem hepatopankreas hem

de solungaçlarda önemli dercede yüksekti. Bu farklılıklar için bir açıklama, farklı serbest radikal üretimi oranları ve dokulardaki farklı antioksidan potansiyeller olabilir (Monteiro ve ark., 2006). Bununla birlikte, biyobelirteçlerin yanıtı sadece dokulara değil, aynı zamanda kullanılan toksik maddenin dozuna da bağlı olabilir (Monteiro ve ark., 2006; Uçkun 2013).

Bu çalışma sonucunda; *A. leptodactylus* türü kerevit için TFS'nin 96 saatlik LC₅₀ değerinin 1824,00 mg AI L⁻¹ olduğu tespit edildi. Kullanılan yeni nesil pestisit olarak adlandırılan TFS'nin *A. leptodactylus* gibi hedef olmayan organizmalar için toksik olabileceği görüldü. Çalışmada TFS'nin bu tür kerevitler için letal ve subletal (LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/4 ve LC₅₀/8) konsantrasyonlarının kullanımlarının, oksidatif stresin göstergesi ve LPO'nun son ürünlerinden biri olan MDA, antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px ve GSH seviyelerinde istatistiksel açıdan önemli değişikliklere yol açtığı tespit edildi. Buradan yola çıkarak, *A. leptodactylus*'un pestisit toksisitesinin belirlenmesi için uygun bir biyoindikatör tür ve seçilen biyobelirteçlerin bu amaçla kullanışlı biyokimyasal parametreler olduğu söylenebilir. Ayrıca, yapılan literatür taramaları sonucunda *A. leptodactylus*'un TFS'ye diğer su canlılarına oranla yüksek oranda dirençli olduğu saptandı.

Elde edilen veriler neticesinde; evsel ve endüstriyel atıklarla kirliliğin arttığı doğal sularda ve kültür şartlarında üretim ve yetiştiriciliğin yapıldığı ortamlarda kerevit üretimini arttırmak ve verimi yükseltmek için TFS'nin belirlenen letal ve subletal dozlarına dikkat edilmesi önerilmektedir. Ayrıca tarımsal alanlardaki verimi arttırmak amacıyla pestisit kullanımındaki riskleri gösterebilmek ve bu konudaki bilinci arttırmak amacıyla bu ve benzeri çalışmaların daha fazla yapılması gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Ackefors, H., Castell, J.D., Boston, L.D., Raty, P., Svensson, M.,** 1992. Standard experimental diets for crustacean nutrition research. II. growth and survival of juvenile crayfish *Astacus astacus* (Linne) fed diets containing various amounts of protein: Carbohydrate and lipid. *Aquaculture*, 104:341-356.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S.,** 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1523(1):37-48.
- Ahmed, R.G.,** 2005. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 15(2):55-63.
- Akkuş, İ.,** 1995. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 58-63s.
- Akpoyraz, M., Durak, İ.,** 1995. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *The Journal of the Faculty of Medicine*, 48:253-262.
- Alpbaz, A.,** 2005. Su ürünleri yetiştiriciliği. Alp Yayınları, İzmir, 27s.
- Arun, S., Subramanian, P.,** 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochem. and Physiol. Part C.*, 147(1):122-128.
- ASTM,** 1998. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX), E1439-98, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM,** Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX), E1439-98, American Society for Testing and Materials, 1998, Philadelphia, PA.
- Atay, D.,** 1997. Kabuklu su ürünleri ve üretim tekniği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 348s.
- Balba, H.,** 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health Part B.*, 42:441-451.
- Balba, H.,** 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health Part B.* 42:441-451.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A.,** 2008. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental*, 2:32-39.

- Banerjee, K., Ligon, A.P., Spitteller, M.,** 2006. Environmental fate of trifloxystrobin in soils of different geographical origins and photolytic degradation in water. *J. Agric. Food Chem.*, 54:9479–9487.
- Barım, Ö.,** 2005. Keban Baraj Gölü’nde yaşayan tatlı su istakozu (*Astacus leptodactylus* esch. 1823) rasyonuna farklı oranlarda ilave edilen vitamin e’nin etkileri. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 73s.
- Barım, Ö., Benzer, F., Erisir, M., Dorucu, M.,** 2009. Oxidant and antioxdan status of tissues of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* esch., 1823) from different stations in the Keban Dam Lake. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18:6.
- Barım, Ö., Karatepe, M.,** 2010. The effects of pollution on the vitamins a, e, c, β carotene contents and oxidative stress of the freshwater crayfish. *Astacusleptodactylus. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:138-142.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B.,** 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci.*, 58(7):649-662.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B.,** 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci.*, 58(7):649-662.
- Belden, J.B., McMurry, S.T., Smith, L.M., Reilley, P.,** 2010. Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmental relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29:2477–2480.
- Bell, J.G., Cowey, C.B., Adron, J.W., Shanks, A.M.,** 1985. Some effects of vitamin e and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 53(1):149-157.
- Borković, S.S., Pavlović, S.Z., Kovačević, T.B., Štajn, A.Š., Petrović, V.M., Saičić, Z.S.,** 2008. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative Biochem. and Physiol. Part C*, 147(1):122-128.
- Bradford, M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Buege, J.A., Aust, S.D.,** 1978. Microsomal lipid peroxidation: In *Methods in enzymology*. Academic Press, 52:302-310.
- Canpolat, Ö.,** 2007. Keban Baraj Gölü’ndeki kirletici kaynaklarının su kalitesi ve *Capoeta trutta* (heckel, 1843)’nın üreme biyolojisi ve gelişimi üzerindeki etkileri. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 336s.
- Carvalho, F.,** 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy*. 9:685–692.

- Cecchine, G., Golomb, B.A., Hilborne, L.H., Spektor, D.M., Anthony, C.R.,** 2000. A review of the scientific literature as it pertains to gulf war illnesses. *Ca Rand*, 8:5-14.
- Çetinkaya, O.,** 1995. Balık besleme. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Van, 137s.
- Chen, H.Y.,** 1998. Nutritional requirements of the black tiger shrimp: *Penaeus monodon*. *Rewievs in Fisheries Science*, 6:79-95.
- Conklin, D.E,** 1995. Vitamins in: Crustacean nutrition. *Advances in World Aquaculture*. 6:123-149.
- D'Abramo, L.R.D., Wright, J.S., Wright, K.H., Bordner, C.E., Conklin, D.E.,** 1985. Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquaculture*, 49:245-255.
- Daloğulları, F.,** 2012. Tatlısu istakozlarında (*astacus leptodactylus* esch. 1823) amonyağın toksik etkilerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi, Ankara, 89s.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K.,** 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52:794-804.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin M.C., Babut, M., Vasseur, P.,** 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39:93-110.
- EPA (Environmental Protection Agency),** 2002. Trifloxystrobin; pesticide tolerance, Rules and Regulations. *Federal Register*, 67(99):35915-35924.
- European Commission.,** 2003. Trifloxystrobin: European commission: Health consumer protection directorate general. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list1-18_en.pdf. 19 Kasım 2020.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu G.,** 2002. Free radicals antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 18(10):872-879.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R.,** 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Public Health*, 4(2):158-165.
- Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S.,** 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology*, 49:243-250.

- Fernández-Ortuño, D., Torés, JA., De Vicente, A., Pérez-García, A., 2010.** Fungicides. Chapter 10. InTech opens science/ open minds. Croatia, 203-220s.
- Filho, D.W., Torres, M.A., Trioess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001.** Influence of seasonal and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34:719-726.
- Goddard, J.S., 1988.** Food and feeding in: Freshwater crayfish biology. Chapman and Hall, London, 45-166s.
- Gökalp., H.Y., Nas, S., Certel, M., 1992.** Biyokimya 1: Temel yapılar ve kavramlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Erzurum, 466s.
- Gözükara, E.M., 2011.** Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 908s.
- Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., 1997.** Pestisitler, *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*. 52:9-173.
- Holdich, D.M., Reeve, I.D., 1988.** Functional morphology and anatomy in: Freshwater crayfish biology. Chapman and Hall, London, 11-51s.
- Hooser, E.A., Belden, J.B., Smith, L.M., McMurry, S.T., 2012.** Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. *Ecotoxicology*. 21:1458–1464.
- Hüter, O., 2011.** Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem Rev.* 10:185–194.
- Jiang, J., Wu, S., Lv, Lu., Liu, X., Chen, L., Zhao, X., Wang, Q., 2019.** Mitochondrial dysfunction, opoptosis and transcriptomic alterations induced by four strobilurins in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Environmental Pollution*, 253:722-730.
- Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N.A., Gillette, J.R., 1974.** Bromobenzene induced liver necrosis: Protective role of glutathione and evidence for bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology*, 11(3):151-169.
- Jugnes, C.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Zenklusen, M.C.C., 2012.** Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere*, 87:1348-1354.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş., 2016.** Serbest radikaller. *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1):50-59.
- Karadede, H., Oymak, S.A., Ünlü, E., 2004.** Heavy metals in mullet, *Liza abu* and catfish, *Silurus triostegus*, from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Environment International*, 30:183-188.
- Kavas, G., 1989.** Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 9:1-8.

- Klaassen, C.D.**, 2001. Casarett Doull's toxicology: The basic science of poisons. McGraw Hill, New York, 883-930s.
- Köksal, G.**, 1988. *Astacus leptodactylus* in Europe in: Freshwater crayfish biology. Chapman and Hall, London, 365-400s.
- Kumlu, M.**, 1998. Karides, istakoz ve midye yetiştiriciliği. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Adana, 340s.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L.**, 1997. Digestibility in: Crustacean nutrition. *Advances in World Aquaculture*, 6:194-237.
- Li, H., Cao, F., Zhao, F., Yang, Y., Teng, M., Wang, C., Qiu, L.**, 2018. Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebra embryos. *Chemosphere*, 207:781-790.
- Liu, L., Jiang, C., Wu, Z.Q., Gong, Y.X., Wang, G.X.**, 2013. Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98:297-302.
- Mazlum, Y., Yılmaz, E.**, 2012. Kerevitlerin biyolojisi ve yetiştiriciliği. Mustafa Kemal Üniversitesi Yayınları, Hatay, 120s.
- Meister, R.T.**, 1999. Farm chemicals handbook 99. Meister Publishing Company Willoughby, USA, 183-186s.
- Memişoğulları, R.**, 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.
- Mercan, U.**, 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15(1-2):91-96.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L.**, 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143:141-149.
- Morrison, S.A., Mcmurry, S.T., Smith, L.M., Belden, J.B.**, 2013. Acute toxicity of pyraclostrobin and trifloxystrobin to *Hyalella Azteca*. *Environmental toxicology and Chemistry*, 32(7):1516-1525.
- Muriana, F.J., Ruiz-Gutiérrez, V., Bolufer, J.**, 1993. Phospholipid fatty acid composition of hepatopancreas and muscle from prawn, *Penaeus japonicus*. *Biochem*, 114:404-407.

- Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E.,** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Tox.col. Pharmacol*, 13:57-149.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S.,** 2003. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *The Science of the Total Environment*, 309:105-115.
- Parlar, H., Arslan, Ö.Ç., Boyacıoğlu, M., Karaaslan, M.A.,** 2009. Ekotoksikoloji. Ege Üniv. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir, 339s.
- Ravi, F., Brenton, K., Louis, E.,** 1999. Effect of a diet supplemented with cod liver oil and sunflower oil on growth, survival and condition indices of juvenile *Cherax tenuimanus* (Smith). *Freshwater Crayfish*, 12:478-493.
- Reynolds, J.R.,** 2002. Growth and reproduction in: Biology of freshwater crayfish *Lowa*. State University Press, USA, 153-191s.
- Sarma, A.D., Mallick, A.R., Ghosh, A.K.,** 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. *Int J Pharm Sci Res.*,1(3):185-192.
- Serrano, R., Simal-Julian, A., Pitarch, E., Hernandez, F., Varo, I., Navarro, J.C.,** 2004. Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture. *Environ Science Technology*, 38(4):1262–314.
- Skurdal, J., Taugbol, T.,** 2002. *Astacus*, in: Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd., UK, 467-510s.
- Sun, Y.I., Oberley, L.W., Li, Y.,** 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3):497-500.
- Thomas, P., Wofford, H.W.,** 1993. Effects of cadmium and aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicology*, 27(1:2):159-177.
- Tosun, N., Karabay, N.U., Sayım, F.,** 2001. Pesticide usage and their potential adverse impacts on living organism. *Journal of Aegean Agricultural Research Institute*. 11(1):113-125.
- URL-1,** 2019. <https://sivilalan.com/2019/12/15/turkiyenin-pestisit-gercegi/>. Türkiye’de pestisit kullanımı. 13 Ekim 2020.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.,** 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64:178-189.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J.,** 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44-84.

- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E.,** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13:57-149.
- Vasseur, P., Leguille, C.,** 2004. Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. *Environmental Toxicology*, 19(4):433-436.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L.,** 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science Of The Total Environment*, 395:87-100.
- Vogt, G.,** 2002. Functional anatomy. Iowa State University Press, Iowa, 53-150s.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T.,** 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19:137-161.
- Yıldız, M., Gürkan, M.O., Turgut, C., Kaya, Ü., Ünal, G.,** 2005. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. *TMMOB Ziraat Mühendisleri 6. Teknik Kongresi*, Ankara, 3-7 Ocak, s. 649-668.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y.,** 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55:167-174.
- Zhu, B., Liu, G.L., Liu, L., Ling, F., Wang, G.X.,** 2015. Assessment of trifloxystrobin uptake kinetics, developmental toxicity and mRNA expression in rare minnow embryos. *Chemosphere*, 120:447-455.
- Zhu, L., Wang, H., Liu, H., Li, W.,** 2013. Effect of trifloxystrobin on hatching: Survival and gene expression of endocrine biomarkers in early life stages of medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology*, 14(2):102-105.